

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie,
Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Herr Prof. Dr. med. M. K. Schilling
Doktorvater: Herr PD Dr. med. O. Kollmar

Einfluss der Blockade von c-KIT auf das Wachstum kolorektaler Metastasen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

vorgelegt von: Gudrun Caroline Yvonne Haberl
geboren am: 08.01.1984 in München

Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger

Gutachter 1.
 2.
 3.

Datum der Promotion:

Für
meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung/Summary.....	1
1.1. Zusammenfassung.....	1
1.2. Summary.....	2
2. Einleitung	3
2.1. Das kolorektale Karzinom.....	3
2.2. Metastasierung des kolorektalen Karzinoms.....	3
2.3. Tumervaskularisierung.....	4
2.4. Endotheliale Progenitorzellen.....	4
2.5. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1).....	5
2.6. c-KIT-Rezeptor und c-KIT-Ligand.....	7
2.7. Ziel der Studie.....	8
3. Material und Methodik.....	10
3.1. Versuchstiere.....	10
3.2. Modell der transparenten Rückenhautkammer.....	10
3.3. Implantation der Rückenhautkammer.....	11
3.4. Partielle Leberresektion.....	13
3.5. Tumorimplantation in die Rückenhautkammer.....	14
3.6. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM).....	15
3.7. Auswertung der IVM.....	17
3.8. Histologie/Immunhistochemie.....	18
3.9. Studiendesign.....	19
3.10. Western Blot Analyse.....	23
3.11. Statistische Auswertung.....	24

4. Ergebnisse.....	25
4.1. Tumorwachstum unter Blockade von c-KIT und SDF-1.....	25
4.2. Tumorangiogenese unter Blockade von c-KIT und SDF-1.....	26
4.3. Tumorzell-Migration und -Infiltration unter c-KIT und SDF-1 Blockade.....	30
4.4. Tumorzellproliferation und -apoptose unter c-KIT und SDF-1 Blockade.....	31
4.5. Western Blot Analyse in vitro.....	33
4.6. Tumorwachstum nach Leberresektion unter Blockade von c-KIT und SDF-1.....	34
4.7. Tumorangiogenese nach Leberresektion unter Blockade von c-KIT und SDF-1....	35
4.8. Tumorzellmigration und – infiltration nach Leberresektion unter Blockade von c-KIT und SDF-1.....	37
4.9. Tumorzellproliferation und -apoptose nach Leberresektion unter Blockade von c-KIT und SDF-1.....	39
5. Diskussion.....	40
5.1. Das transparente Rückenhautkammer-Modell	40
5.2. Chemokine und die Wirkung von SDF-1 auf Tumorzellen.....	42
5.3. Einfluss von EPCs und HCs auf die Angiogenese.....	45
5.4. Einfluss der Knochenmarksuppression auf die Angiogenese.....	46
5.5. Einfluss von anti-c-KIT und anti-SDF-1 auf das Tumorwachstum.....	48
5.6. Auswirkungen der Leberresektion auf das Tumorwachstum.....	49
5.7. Schlussfolgerung.....	51
6. Literaturverzeichnis.....	52
7. Danksagung.....	65
8. Publikationen.....	66
9. Lebenslauf.....	68

1. Zusammenfassung/Summary

1.1. Zusammenfassung

Das Überleben und die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen (HCs) wird durch die Bindung des Stammzellsfaktors an seinen Rezeptor c-KIT reguliert. Die Migration der HCs wird durch das Chemokin stromal cell-derived factor (SDF)-1 gesteuert. Die Mobilisierung von c-KIT⁺ HCs führt zu einer Vaskulogenese im Tumor. Somit könnte durch die Blockade von c-KIT das Tumorwachstum beeinflusst werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde 48 Balb/c-Mäusen nach Rückenhautkammerpräparation CT26-GFP kolorektale Tumorzellen in die dorsale Rückenhautkammer implantiert und in sechs Gruppen zu je acht Mäusen eingeteilt. Die eine Gruppe wurde mit anti-c-KIT-Antikörper an vier aufeinander folgenden Tagen behandelt. Eine weitere Gruppe wurde ebenfalls mit anti-c-KIT-Antikörper behandelt, erhielt zusätzlich noch anti-SDF-1. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde ein isotyp-spezifischer Kontrollantikörper verabreicht. Die anderen drei Gruppen wurden nach dem gleichen Antikörperschema behandelt, erhielten aber darüber hinaus eine 70%-ige Leberresektion. Angiogenese, Tumorwachstum, Tumorzellproliferation und -apoptose wurden mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, Histologie, Immunhistochemie und Western Blot Analysen untersucht.

Die c-KIT Blockade verstärkte das Anwachsen der Tumorzellen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Effekt wurde durch eine Stimulation der Tumorzellproliferation und -invasion bewirkt, ohne dabei die Tumervaskularisierung entscheidend zu beeinflussen. Darüber hinaus führte die c-KIT Blockade zu einer verstärkten VEGF und CXCR4 Expression im wachsenden Tumor. Die Neutralisierung von anti-SDF-1 antagonisierte das durch anti-c-KIT vermittelte gesteigerte Tumorwachstum durch Hemmung der Neovaskularisierung, Tumorzellproliferation und muskulären Infiltration. In den Tumoren der Tiere nach 70%-iger Leberresektion führte die kombinierte anti-c-KIT und anti-SDF-1 Applikation zu einer deutlichen Verringerung der Apoptose und Proliferation.

Anhand der Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Knochenmarksuppression durch eine anti-c-KIT Behandlung das Anwachsen kolorektaler Metastasen verstärkt, vermittelt durch eine Interaktion mit dem SDF-1/CXCR-4 Signalweg.

1.2. Summary

Survival and proliferation of hematopoietic cells (HCs) are regulated by binding the stem cell factor to its receptor c-KIT. The migration of HCs is directed by the chemokine stromal cell-derived factor (SDF)-1. Mobilisation of c-KIT⁺ HCs contributes to angiogenesis in tumors. Therefore, targeting migration of HCs provides a promising new strategy of anti-tumor therapy.

After dorsal skinfold chamber preparation, forty-eight BALB/c mice were implanted syngeneic green fluorescent protein-transfected CT26 colorectal cancer cells into the chambers. The mice were separated in six groups (n=8). One of the groups was pretreated with a monoclonal anti-c-KIT-antibody daily for 4 days. Another group was also pretreated with the anti-c-KIT-antibody and, additionally, received a neutralizing anti-SDF-1 antibody after tumor cell implantation. As control, one group was injected an isotype-matched control antibody. The other three groups were accordingly treated with the anti-bodies, but the animals were additionally hepatectomized. Angiogenesis, cytokine expression, tumor cell proliferation, tumor growth and apoptosis were investigated using intravital fluorescence microscopy, histology, immunohistochemistry and western blot analysis.

Blockade of c-KIT significantly enhanced tumor cell engraftment compared to controls due to stimulation of tumor cell proliferation and invasion, however, without markedly affecting tumor vascularization. Besides, c-KIT blockade significantly increased VEGF and CXCR4 expression within the growing tumors. Neutralization of SDF-1 completely antagonized this anti-c-KIT-associated tumor growth by suppression of tumor neovascularization, inhibition of tumor cell proliferation and muscular infiltration. The injection of anti-c-KIT and anti-SDF-1 in the animals after 70% hepatectomy caused a reduction of apoptosis and proliferation.

The study indicates that bone marrow suppression via anti-c-KIT pretreatment enhances tumor cell engraftment of colorectal metastases due to interaction with the SDF-1/CXCR4 pathway which is involved in HC-mediated tumor angiogenesis.

2. Einleitung

2.1. Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist die vierthäufigste Krebserkrankung weltweit [1]. In den Vereinigten Staaten ist das kolorektale Karzinom die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern im Alter von 40 bis 79 Jahren [75]. In dieser Studie konnte basierend auf Daten der Amerikanischen Krebsgesellschaft eine abnehmende Neuerkrankungsrate von 1998 bis 2003 bei Männern und Frauen festgestellt werden. Die Inzidenz sank in diesem Zeitraum bei beiden Geschlechtern um 2,1%. Diese Entwicklung konnte auf verbesserte Vorsorgeuntersuchungen und Screeningverfahren zurückgeführt werden [75]. Trotz der optimierten Behandlungstechniken und Prophylaxe erkrankten im Jahre 2004 insgesamt 279000 Menschen in den 25 EU-Staaten am kolorektalen Karzinom (International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, 2005).

Das kolorektale Karzinom, histologisch ein Adenokarzinom, ist für 95% aller malignen Kolontumore verantwortlich [69].

Der Altersgipfel der Neuerkrankungen liegt beim Mann bei 69 Jahren, bei der Frau bei 75 Jahren (Quelle Saarländisches Krebsregister 2007), wobei zahlreiche Faktoren für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms verantwortlich sind. Neben der genetischen Prädisposition z. B. familiäre adenomatöse Polyposis oder hereditäres nicht polypöses kolorektale Karzinom, spielen Lebensgewohnheiten, wie die vermehrte Aufnahme tierischer Fette und Alkohol, eine große Rolle [71]. Auch die verminderte Zufuhr von Ballaststoffen und wenig körperliche Aktivität sind Faktoren, die das Erkrankungsrisiko steigern [18].

2.2. Metastasierung des kolorektalen Karzinoms

Neben Lunge, Knochen und Gehirn metastasiert das kolorektale Karzinom bevorzugt in die Leber [54]. Die Fernmetastasen, nicht der Primärtumor, sind in den meisten Fällen die Todesursache der Patienten [1; 51]. Bei 15-20% der Patienten mit kolorektalem Karzinom ist dieses zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits in die Leber metastasiert [52], während die Hälfte der Patienten im Laufe ihrer Krankheit Lebermetastasen bekommen [133]. Doch nur bei 10-20% der Patienten mit hepatischen Metastasen ist eine kurative Resektion möglich [14]. Der Großteil der Patienten kann auf Grund von multinodulären Läsionen oder extrahepatischer Metastasierung nicht mehr kurativ behandelt werden. In

der Vergangenheit wurden diese Patienten lediglich palliativ behandelt und hatten dadurch nur eine mittlere Überlebenszeit von 15 Monaten [3]. Allerdings führt eine effektive adjuvante Chemotherapie zum Downstaging der Metastasen, sodass der anfangs nicht operable Patient einer Leberresektion zugeführt werden kann. BISMUTH et al. erreichten in ihrer Studie an 53 anfangs nicht resektablen Patienten mit kolorektalem Karzinom nach erfolgreicher neoadjuvanter Chemotherapie und anschließender Leberresektion eine 5-Jahresüberlebensrate von 40%. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die komplette Resektion aller kolorektalen Metastasen für das Überleben der Patienten wichtiger ist als die Lokalisation und die Zahl der Metastasen [42].

2.3. Tumervaskularisierung

Die Bildung neuer Blutgefäße ist essentiell für das Wachstum eines Tumors. Die Entstehung neuer Gefäße im Tumorgewebe geht auf zwei Arten von Gefäßneubildungen zurück, die Angiogenese und die Vaskulogenese. Die Angiogenese beschreibt die Sprossung neuer Gefäße aus bereits vorhandenen Blutgefäßen [22; 124; 132]. Unter Vaskulogenese versteht man die de novo Bildung von Blutgefäßen durch Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen (EPCs) und endothelialer Zellen (ECs) [108]. Normalerweise befinden sich ECs im Ruhezustand [61]. Durch bestimmte Reize (z. B. durch Hypoxie) werden die ECs zu einer Konversion angeregt, die eine Veränderung der Zellform zur Folge hat. Diese Formänderung ermöglicht zum einen die Migration, zum anderen geht sie mit einer erhöhten Sekretion proteolytischer Enzyme einher, die den Abbau der Basalmembran und der Extrazellulärmatrix bewirken [40; 61]. Darüber hinaus wird die Sensitivität für angiogene Faktoren durch Modulation der Rezeptorexpression erhöht. Dieser komplexe Vorgang, der die Umschaltung der endothelialen Zellen von der Ruhephase in die proliferative Phase beschreibt, wird als „angiogenic switch“ bezeichnet [2; 61].

2.4. Endotheliale Progenitorzellen

EPCs gehören zu den hämatopoetischen Stammzellen, die sich sowohl im Knochenmark als auch frei zirkulierend im peripheren Blut befinden [102]. Die zwei wesentlichen Funktionen der EPCs ist die Reparatur verletzter Gefäße und die Vaskulogenese (siehe Abbildung 1) [141]. Während des Prozesses der Reendothelialisierung und der Neovaskularisierung differenzieren die EPCs im ischämischen oder verletzten Gewebe zu ECs. Die Rekrutierung der EPCs aus dem Knochenmark ist Chemokin- und Wachstumsfaktor-

abhängig [26]. Die einzelnen Mechanismen der Mobilisierung und Differenzierung der EPCs ist bis jetzt jedoch noch nicht vollständig geklärt [141].

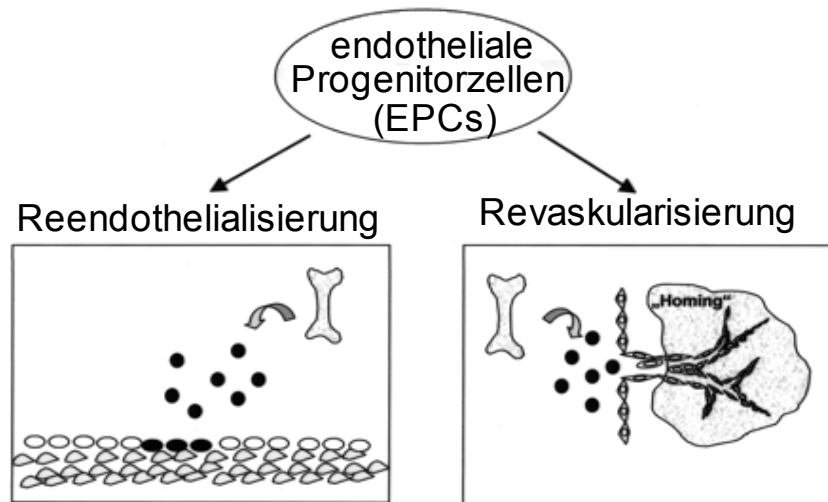


Abbildung 1: Die endothelialen Progenitorzellen (EPCs)

Die EPCs sind notwendig zur Reendothelialisierung und Revaskularisierung von defekten Gefäßen. Abbildung nach [141].

Der vermehrte Sauerstoffbedarf eines Tumors bewirkt im Tumorgewebe eine erhöhte Rekrutierung von im Blut zirkulierenden EPCs [13; 94]. Zusätzlich werden vermehrt EPCs aus dem Knochenmark mobilisiert und von dem Ruhemodus in den proliferativen Modus überführt [67]. Das heißt die EPCs gehen in den Zellzyklus über. An der Regulation der Proliferation, Mobilisierung und Migration von EPCs sind zahlreiche Faktoren beteiligt (siehe Abbildung 2), unter anderem der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor (VEGF)), der von Stromazellen freigesetzte Faktor (stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)), der Granulozyten-stimulierende Faktor (granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)), die Matrix-Metalloprotease-9 (MMP-9) und der c-KIT Ligand [68; 141].

2.5. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)

Chemokine sind eine Gruppe von Cytokinen, die verschiedene zelluläre Funktionen verändern und chemotaktisch auf andere Zellen wirken [59].

Das Chemokin stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), nach neuerer Nomenklatur als CXCL12 bezeichnet, gehört zur CXC-Gruppe der Chemokine. Es spielt eine große Rolle in der Pathophysiologie zahlreicher Vorgänge z.B. der Angiogenese, der Migration der Lymphozyten, der Wundheilung, des Tumorwachstums und der Metastasierung [16; 64;

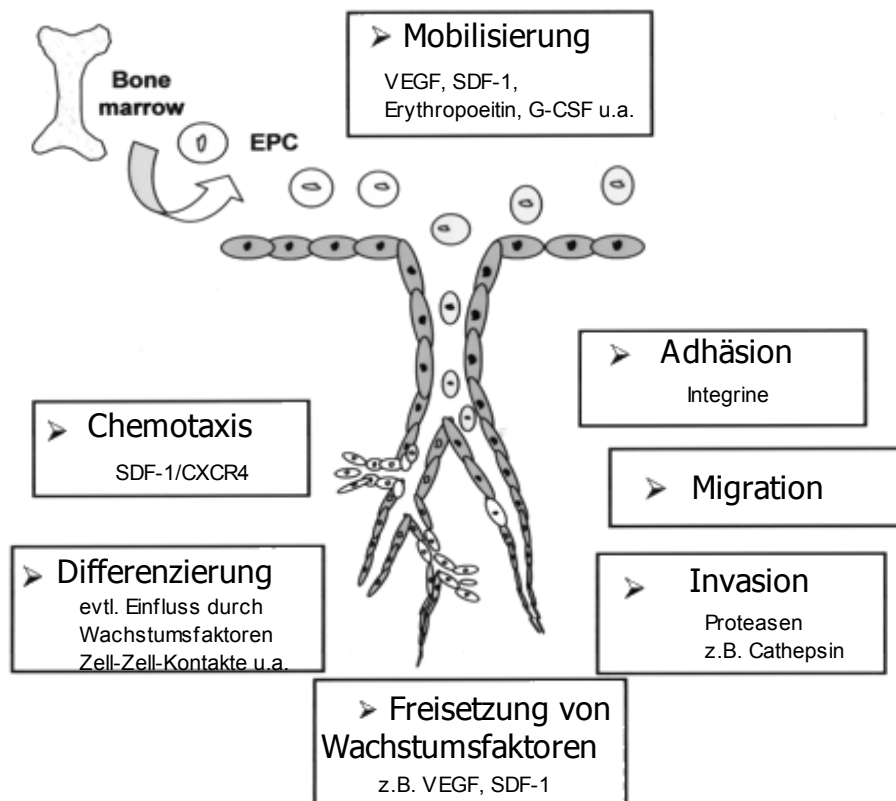


Abbildung 2: Die Funktionen der endothelialen Progenitorzellen.

Mechanismus des "homings" und der Differenzierung der EPCs. Die Rekrutierung und die Eingliederung der EPCs in ischämisches Gewebe erfolgt in einem mehrstufigen Prozess: Mobilisierung, Chemotaxis, Adhäsion, Migration, Gewebeinvasion und Differenzierung. Abbildung nach [141]; VEGF = vascular endothelial growth factor, G-CSF = granulocyte colony stimulating factor, SDF-1 = stromal cell-derived factor -1.

103]. Das Chemokin SDF-1 wirkt chemotaktisch auf Leukozyten, hämatopoetische Stammzellen und Endothelzellen [47; 60; 143]. SDF-1 bindet an den G-Protein gekoppelten Rezeptor CXCR4, der auf zahlreichen Zellen exprimiert wird, unter anderem auf T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen, endothelialen Zellen und Hepatozyten [46; 125; 143]. Eine Hemmung von SDF-1 zum Beispiel bei Mammakarzinomen zeigte ein signifikant vermindertes Tumorwachstum und eine deutlich geringere Neovaskularisierung der Tumoren [110]. Außerdem führte ein Fehlen von SDF-1 bei einer Blockade des SDF-1 Rezeptors CXCR-4 in Mäusen zur fehlerhaften Ausbildung gastrointestinaler Blutgefäße [136]. Eine Erhöhung von SDF-1 hingegen resultierte in einer vermehrten, c-KIT-Ligand abhängigen Mobilisierung von EPCs und hämatopoetischen Progenitorzellen (HPCs) aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf [63; 68; 110]. Diese Rekrutierung von EPCs wird als endokriner Effekt von SDF-1 bezeichnet. Zusätzlich kann SDF-1 auch parakrin eine vermehrte Expression des Rezeptors CXCR-4 auf

Karzinomzellen bewirken, was ebenfalls zu einer Stimulierung des Tumorwachstums beiträgt. [110].

2.6. c-KIT-Rezeptor und c-KIT-Ligand

Der c-KIT Rezeptor (c-KIT), ein 145 kDa transmembranöses Glycoprotein, ist essentiell für die Bildung von hämatopoetischen Zellen, endothelialen Zellen, lymphozytären Zellen, Melanozyten, Keimzellen, intestinalen Kaval-Zellen und Mastzellen [68]. Er gehört zu den membranständigen Rezeptortyrosinkinasen Typ III. Er wird auch Stammzellfaktorrezeptor oder CD117 genannt, und wurde als zelluläres Homolog des viralen Onkogens v-KIT charakterisiert [148]. Der Rezeptor wird unter anderem auf kardialen, hämatopoetischen, epithelialen und endothelialen Stammzellen exprimiert [67; 68; 117; 111]. Im Knochenmark wird der c-KIT-Rezeptor vermehrt auf den Progenitorzellen, den Vorstufen der hämatopoetischen, endothelialen und lymphatischen Zellen ausgebildet [101]. Während der Entwicklung von der Progenitorzelle zur Endzelle wird die Expression des c-KIT-Rezeptors heruntergeregt [56; 117]. Nur die Mastzellen zeigen nach vollkommener Ausreifung weiterhin eine sehr hohe c-KIT-Rezeptordichte.

Der Ligand des c-KIT-Rezeptors ist der c-KIT Ligand (c-KIT-L), der auch als Mastzellwachstumsfaktor (mast cell growth factor), steel factor oder Stammzellfaktor (SCF) bezeichnet wird [5; 30; 72; 146; 151]. Es existieren zwei Formen des c-KIT-L, ein membrangebundener c-KIT-L und ein gelöster c-KIT-L. Solange der membrangebundene c-KIT-L an seinen Rezeptor auf der Stromazelle gebunden ist, verweilen die Zellen im Knochenmark im Ruhezustand [49; 67]. Ein Anstieg von SDF-1 oder angiogenen Faktoren, wie VEGF, bewirkt eine erhöhte MMP-9 Expression in hämatopoetischen Stammzellen [68; 141]. MMP-9 spaltet proteolytisch die Bindung zwischen dem membrangebunden c-KIT-L und seinem Rezeptor, so dass vermehrt gelöster c-KIT-L entsteht [67]. Der freigewordene c-KIT-L bindet dann seinerseits an Rezeptoren auf hämatopoetischen Stammzellen. Diese hämatopoetischen Stammzellen werden nun zur Teilung und erhöhter Rekrutierung angeregt.

Eine Blockade des c-KIT Rezeptors durch einen monoklonalen Antikörper führt zu einer Suppression der Hämatopoese auf Knochenmarksebene. Durch diese Proliferationshemmung der hämatopoetischen Zellen wird die Ausbildung endothelialer Gefäßnetzwerke vermindert [108]. Der monoklonale Antikörper (anti-c-KIT-Antikörper) richtet sich

gegen die c-KIT-L-Bindungsstelle und verhindert so die Rekrutierung und die Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen [15] (siehe Abbildung 3).

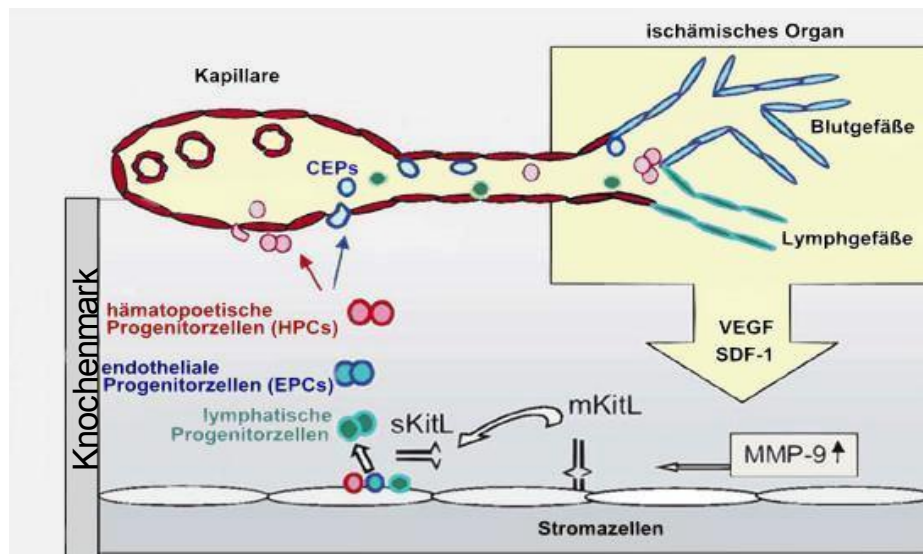


Abbildung 3: Mobilisierung und Rekrutierung endothelialer, lymphatischer und hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen.

Eine Ischämie im Gewebe resultiert in einer Erhöhung angiogener Faktoren (z.B. VEGF und SDF-1), die die Matrix-Metalloprotease (MMP-9) aktivieren. MMP-9 spaltet den gebundenen c-KIT-Liganden (mKitL) ab. Der gelöste c-KIT-Ligand (sKitL) verstärkt die Proliferation der hämatopoetischen, lymphatischen und endothelialen Progenitorzellen. Darüber hinaus führt diese c-KIT- abhängige Aktivierung zu einer verstärkten Mobilisierung der Progenitorzellen in den Blutkreislauf, z.B. zirkulierende endotheliale Progenitorzellen, und zum Homing der Zellen im ischämischen Gewebe. Die so mobilisierten Progenitorzellen werden zur Ausbildung neuer Gefäße verwendet, was als Vaskulogenese bezeichnet wird. Abbildung nach [121].

2.7. Ziel der Studie

Klinische und experimentelle Studien haben gezeigt, dass Chemokine die Angiogenese, die Proliferation und die Apoptose von Tumorzellen regulieren. Daneben bestimmen sie die Invasion und den organspezifischen Transport von Tumorzellen, was zur Ausbildung von Metastasen führt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es durch eine anti-c-KIT-Gabe zu einer Suppression des Knochenmarks kommt. Das hatte wiederum eine Reduktion der Tumorangiogenese im kolorektalen Karzinom zur Folge [108].

Bisher liegen keine Studien vor, die untersucht haben, ob nach Leberresektion eine Knochenmarksuppression und/oder eine anti-SDF-1 Gabe das Anwachsen kolorektaler Karzinomzellen in extrahepatischem Gewebe hemmt. Darüber hinaus wurde der Effekt der Knochenmarksuppression und einer anti-SDF-1 Applikation auf das Wachstum bereits etablierter Metastasen bis jetzt noch nicht analysiert. In der vorliegenden Arbeit soll durch

die Verwendung eines etablierten Tiermodells für kolorektale Metastasen untersucht werden, welchen Einfluss eine Blockade von SDF-1 und eine Knochenmarksuppression auf das Tumorwachstum von bereits etablierten Metastasen hat. Der Einfluss der Leberresektion auf das Tumorwachstum unter anti-c-KIT Gabe und anti-SDF-1 wird ebenfalls analysiert.

3. Material und Methodik

3.1. Versuchstiere

Die Tierversuche wurden mit Genehmigung des Veterinäramtes Saar-Pfalz-Kreis durchgeführt und entsprachen den Vorgaben des Tierschutzgesetzes.

Die Versuche wurden an Balb/c Mäusen (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland) im Zeitraum von November 2005 bis April 2007 im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar durchgeführt. Verwendet wurden 20-23 g schwere weibliche Balb/c Mäuse. Die Tiere wurden mit Standardlaborfutter (Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und freiem Zugang zu Trinkwasser in Einzelkäfigen gehalten. Durch eine konstante Raumtemperatur von 22-24 °C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 60-65% und einem geregelten 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus wurden standardisierte Bedingungen gewährleistet.

3.2. Modell der transparenten Rückenhautkammer

Zur Untersuchung des Tumorwachstums und der Angiogenese wurde das Mikrozirkulationsmodell der Rückenhautkammer verwendet, das sich schon in zahlreichen Studien bewährt hat [79; 80; 83; 92; 96; 97]. Vorteil dieses Modells ist die Möglichkeit einer kontinuierlichen und regelmäßigen Quantifizierung der Neovaskularisierung und des Tumorwachstums unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Tumorzellen über Tage bis Wochen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie.

Die Rückenhautkammer besteht aus zwei Titanhälften (Gewicht 3,2 g), die mit Hilfe von Schrauben und Muttern verbunden und mit Haltefäden an der Rückenhaut der Maus befestigt werden (siehe Abbildung 4). Das Beobachtungsfenster (15 mm Durchmesser) wurde mit einem runden Deckglas und einem Sprengring verschlossen. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie (IVM) konnten Veränderungen in dem Sichtfenster während des Versuches in regelmäßigen Abständen registriert und mit Hilfe eines Computerprogrammes quantifiziert werden.



Abbildung 4: Die Rückenhautkammer

Die Rückenhautkammer besteht aus Titan. Das Beobachtungsfenster (15mm Durchmesser) ist mit einem Sprengring und einem Deckglas wieder verschließbar [78].

3.3. Implantation der Rückenhautkammer

Für operative Eingriffe wurden die Tieren mit einer intraperitonealen Injektion von 90 mg/kg Körpergewicht Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Pharmacia GmbH, Erlangen) und 20 mg/kg Körpergewicht Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) anästhesiert.

Das Fell der Rückenhaut wurde mittels Elektrorasur (Elektra II GH204, Aesculap, Tuttlingen) und anschließender Behandlung mit Enthaarungscreme (Plica med Creme, Asid Bonz, Böblingen) vollständig entfernt und die freigelegte Haut unter lauwarmem fließendem Wasser gereinigt.

Auf Höhe des Schulter- und Hüftgelenkes wurde die Rückenhaut mittels Haltefäden unter Gegenlicht so aufgespannt, dass die Hauptstammgefäße auf beiden Seiten der Hautfalte deckungsgleich waren. Der hintere Teil der Kammerhälfte, der schon mit Schrauben und Muttern versehen war, wurde mit Haltefäden am Rand der Hautfalte befestigt. Nach Inzision der Haut konnten die Verbindungsschrauben nach vorne durchgeführt werden. Die Kammerhälften wurden dabei möglichst mittig zwischen den beiden Hauptstammgefäßen positioniert, so dass diese durch die Schrauben nicht verletzt werden konnten.

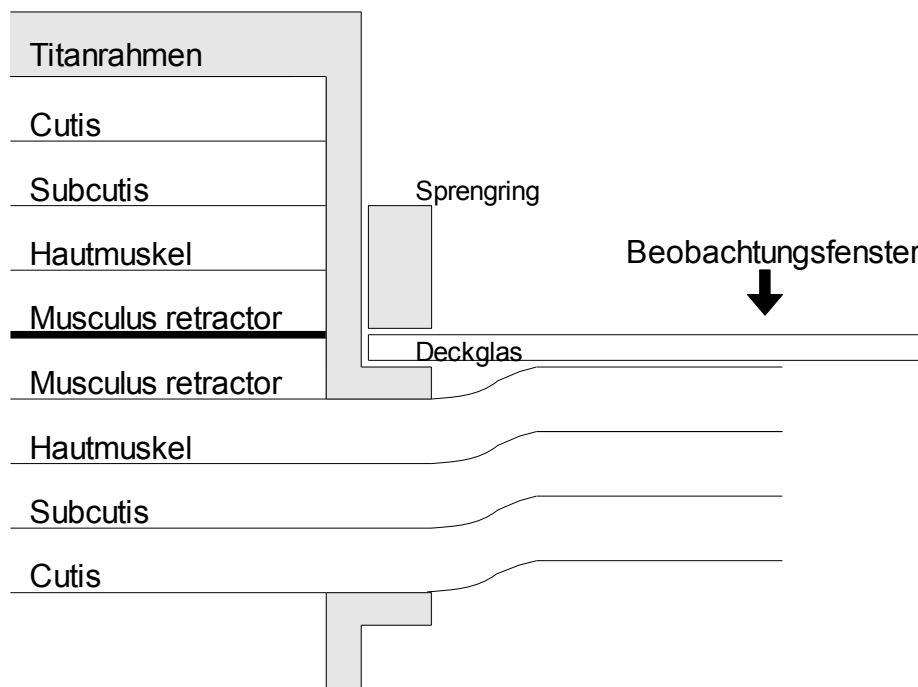


Abbildung 5: Schematische Übersicht der Gewebeschichten innerhalb der Kammerpräparation

Die doppelte Rückenhaut der Mäuse wird kreisrund bis auf den unteren Hautmuskel frei präpariert, dann wird die Rückenhautkammer mit Schrauben und Nähten angebracht und das Beobachtungsfenster mit einem Deckglas und einem Sprengring verschlossen.

Nach Fixation des hinteren Teils der Kammer mittels zweier Klemmen an den Verbindungsschrauben wurde unter Gegenlicht das Beobachtungsfenster angezeichnet und das Versuchstier anschließend in Seitenlage positioniert. Die oberen Hautschichten (Cutis, Subcutis, Hautmuskel, Musculus retractor) wurden unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes (Wild, Heerbrugg M650; Leitz, Schweiz) vorsichtig abpräpariert (siehe Abbildung 5) und die freigelegte Muskelschicht mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung mehrmals gespült, so dass kleinere Blutungen gestillt und das freipräparierte Gewebe ausreichend befeuchtet wurde. Nach Montage der vorderen Kammerhälfte wurde das Beobachtungsfenster mittels eines runden Deckglases und eines Sprengrings luftdicht, luftblasenfrei und steril verschlossen. Die Tiere wurden dann bis zum vollständigen Aufwachen vor einer Rotlichtlampe platziert, um eine Unterkühlung zu verhindern. Nach Abschluss der Kammerpräparation konnte sich die Maus frei bewegen (siehe Abbildung 6).

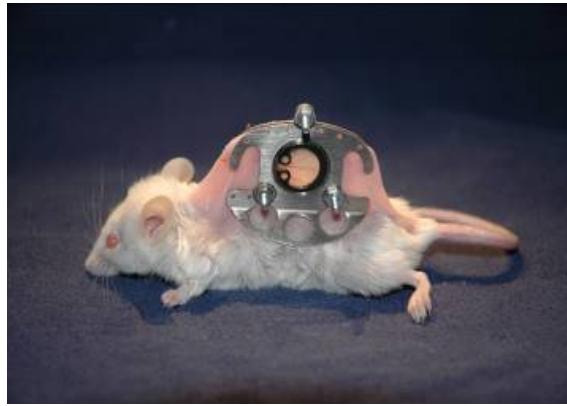
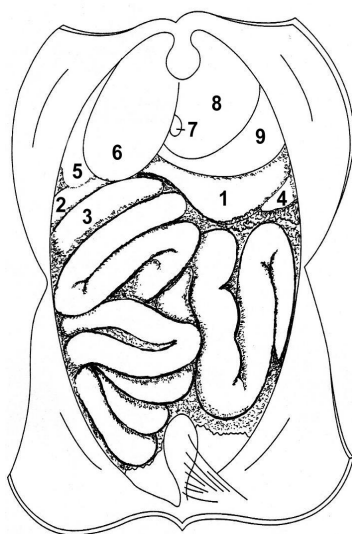


Abbildung 6: Maus mit Rückenhautkammer

Balb/c Maus mit transparenter Rückenhautkammer nach Aufwachen aus der Narkose.

3.4. Partielle Leberresektion

Zwei Tage nach Implantation der Rückenhautkammer erfolgte bei den dafür vorgesehenen Tieren (vgl. Studiendesign) eine 70%-ige Leberresektion (PHX). Dabei wurden drei Leberlappen, der Lobus sinister hepatis lateralis, medialis und der Lobus dexter hepatis medialis nach Ligaturlegung entfernt. Hierfür wurde unter Narkose nach Elektrorasur des Abdomens, des distalen Thorax und der Flanke eine mediane Laparotomie entlang der Linea alba durchgeführt. Das Xyphoid wurde freipräpariert und das Ligamentum falciforme zwischen Lobus sinister hepatis medialis und Lobus dexter hepatis medialis entfernt (siehe Abbildung 7).



- 1 - Magen
- 2 - Duodenum ascendens
- 3 - Jejunum
- 4 - Milz
- 5 - Lobus dexter hepatis lateralis
- 6 - Lobus dexter hepatis medialis
- 7 - Gallenblase
- 8 - Lobus sinister hepatis medialis
- 9 - Lobus sinister hepatis lateralis

Abbildung 7: Skizze des Abdomens der Maus
nach [65]

Der Lobus sinister hepatis lateralis, medialis und der Lobus dexter hepatis medialis wurden mittels einer Ligatur mit resorbierbarem Faden (Vicryl ® 5-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) abgebunden und anschließend hilusnah reseziert. Die Gallenblase durfte bei der Resektion weder verletzt noch entfernt werden. Anschließend wurde mit 0,9 % NaCl das Abdomen gespült, wovon 1 ml in der Bauchhöhle verblieb um eine Dehydrierung des Tieres zu vermeiden. Der Bauchraum wurde abschließend mit einer fortlaufenden Naht (Prolene ® 4-0, Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Durchschnittlich wurde bei dieser partiellen Leberresektion $0,49 \pm 0,06$ g Lebergewebe entfernt.

3.5. Tumorimplantation in die Rückenhautkammer

Die Tumorzellen wurden 48 h nach Präparation der Rückenhautkammer in die Kammer implantiert. Dabei wurden Adenokarzinomzellen des Kolons der Zelllinie CT-26.WT (ATCC CRL-2638 ®, LGC Promochem GmbH, Wesel, Deutschland) verwendet. Die CT-26.WT Zelllinie wurde als Monolayer in RPMI 1640 Medium kultiviert und diesem 2 mM L-Glutamin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), 10%-iges Kälberserum (FCS Gold, PAA Laboratories, GmbH, Cölbe, Deutschland), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories GmbH) hinzugefügt. Bei 37°C wurden die Zellen bei einer Luftfeuchtigkeit von 90% und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit CLONfectin (Clontech, Palo Alto, CA, USA) entsprechend der Herstellungsanleitung [84] behandelt und so mit dem GFP-Expressionsvektor pEGFEP-N1 transfiziert (Green Fluorescent Protein, pEGFEP-N1 Vektor von Clontech). Dadurch wurden die Tumorzellen fluoreszenzmarkiert und konnten ohne zusätzliche Gabe von Fluoreszenzmarker mit dem Intravitalmikroskop sichtbar gemacht werden. Für die Experimente wurden nur Zellen aus den ersten drei Passagen benutzt. Am Tag der Tumorzellimplantation wurden die adhärenenten CT26-GFP Zellen durch Gabe von Trypsin (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA, PAA Laboratories GmbH) gelöst und zweimal in Phosphat-gepuffertem Kochsalz (PBS, PAA Laboratories GmbH, Österreich) gewaschen.

Zur Implantation der Tumorzellen wurde das narkotisierte Tier auf einer Plastikbühne in Seitenlage befestigt und sowohl der Sprengring als auch das Deckglas entfernt. Es wurden 2 µl (entsprechen einer Anzahl von 1×10^5) der in PBS gelösten Zellen in das obere Drittel der Kammer implantiert und diese mit einem neuen Deckglas und Sprengring schnellstmöglich wieder verschlossen, um ein Austrocknen oder Verschmutzen der Kammer zu vermeiden. Direkt im Anschluss an die Tumorimplantation

wurde zur Kontrolle der Tumorgröße, -lage und -form eine Intravitalmikroskopie durchgeführt. Der Tumor sollte nach Implantation rund und ohne Ausläufer und Streuung sein.

3.6. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM)

Die Methode der intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist ein in vielen Studien etabliertes Verfahren zur Analyse zahlreicher dynamischer Mechanismen, z.B. der Angiogenese, der Mikrozirkulation, der Wundheilung und des Tumorwachstums [96]. Die Technik erlaubt eine wiederholte Untersuchung der lebenden Versuchstiere über den gesamten Zeitraum des Versuches. Die anschließende quantitative Auswertung der Daten erfolgte computergestützt, standardisiert und off-line.

Zur Intravitalmikroskopie wurde ein modifiziertes Zeiss-Mikroskop (Axiotech, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet, das mit einer Videokamera (FK 6990B-IQ, COHU, Prospective Measurements Inc., San Diego, CA, USA) ausgestattet war (siehe Abbildung 9). Das Mikroskop war sowohl mit einer Durchlicht- (Kaltlichtlampe, Osram GmbH, München Deutschland) als auch mit einer Auflichteinrichtung (100-W HBO Quecksilberlampe) versehen. Um die GFP-transfizierten Zellen darstellen zu können, wurde ein integrierter Filterblock mit einem Blaulichtfilter mit 450-490nm Exzitations- und mehr als 520nm Emissionswellenlänge benutzt.

Verwendet wurden drei verschiedene Objektive mit folgenden Vergrößerungen:

4x (UplanFI, Olympus, Japan, n.A. 0,13) für Übersichtsaufnahmen, 10x (Plan Neofluar, Carl Zeiss, Jena, Deutschland, n. A. 0,30) und 20x (Wasserimmersion: Achroplan, Carl Zeiss, Jena, Deutschland, n.A. 0,50) zur Untersuchung der Mikrozirkulation und des Tumorwachstums. Mit dem 20x Wasserimmersionsobjektiv konnte eine 250-fache Vergrößerung auf einem 17 Zoll Bildschirm erzielt werden.

Die Bilder wurden über die Videokamera an einen Videorekorder (VO-5800 PS, Sony, München Deutschland) weitergeleitet und auf Super-VHS-Videokassetten (Fuji Magnetics GmbH, Kleve, Deutschland) gespeichert. Ein Videotimer (VTG 33; FOR-A Company Ltd., Japan) erlaubte eine Dokumentation der Tiernummer und des Untersuchungszeitpunktes. Mit Hilfe eines zwischengeschalteten Videomonitors (PVM 1444; Sony, Tokyo, Japan) konnte die Untersuchung über die gesamte Dauer beobachtet und überprüft werden.

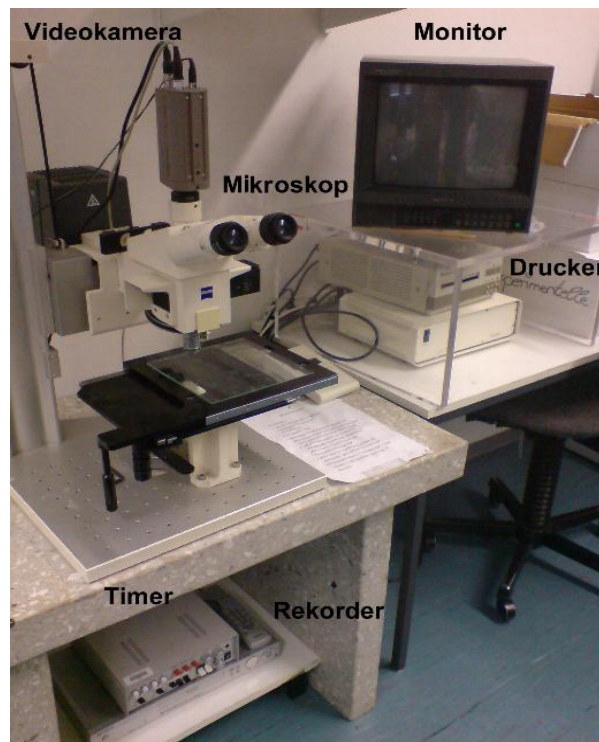


Abbildung 8: intravitales Fluoreszenzmikroskop

Zur regelmäßigen Untersuchung der Tiere wurden diese in Narkose mikroskopiert. Die Untersuchung wurde mit dem Rekorder aufgezeichnet und konnte in Echtzeit über den Monitor verfolgt werden.

Zur Intravitalmikroskopie wurden die narkotisierten Tiere auf einer Plexiglasplatte so befestigt, dass die Rückenhautkammer plan und waagrecht fixiert war.

Um die Tumorgröße bestimmen zu können, wurde mit dem 4x Objektiv eine Aufnahme des gesamten Tumors gemacht. Mit dem 10x Objektiv wurden 12 Beobachtungsareale (siehe Abbildung 9) aufgezeichnet, vier im Tumorzentrum (Feld A-C) und acht am Tumorrund (Feld I-VIII), bei denen pro Beobachtungsfeld 75% Tumor- und zu 25% Normalgewebe zu sehen war. Dabei mussten auch alle migrierten Tumorzellen erfasst werden, die sich außerhalb des Beobachtungsfeldes befanden. Mit dem 20x-Wasserimmersionsobjektiv wurden vier Zentrumsfelder (A-D) und 16 Randfelder aufgenommen (siehe Abbildung 9). Von diesen 16 Randfeldern beinhalteten acht (Feld 1a-8a) nur die außerhalb des dichten Tumorzellrasens liegenden migrierten Zellen, wobei die anderen acht Felder (Feld 1b-8b) am Tumorrund gelegen waren und nur Tumorgewebe zeigten.

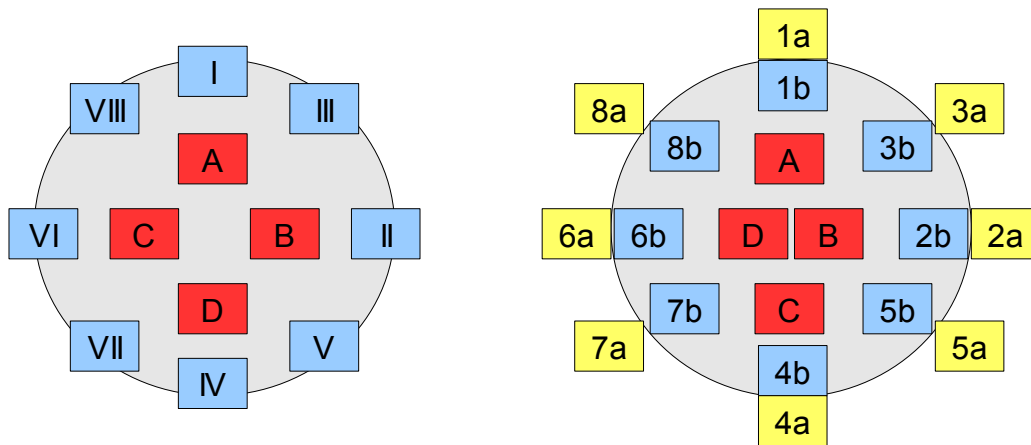


Abbildung 9: Anordnung der Beobachtungsfelder für die intravitalmikroskopische Analyse

Die Tumore wurden in verschiedene Felder eingeteilt, und bei jedem Untersuchungszeitpunkt dasselbe Feld analysiert (links 10x Objektiv, rechts 20x Wasserimmersionsobjektiv).

3.7. Auswertung der IVM

Die computerassistierte Auswertung der gewonnenen Daten aus der Intravitalmikroskopie erfolgte mit der Bildanalysesoftware CAPIMAGE (Version 6.02, ZeintlSoftware Engineering, Heidelberg, Deutschland).

Die GFP-transfizierten Tumorzellen erlaubten eine präzise Abgrenzung des Tumors von dem umgebenden Gewebe.

Die Tumorfläche (in mm^2) wurde durch Umranden des Tumors in der 4x Vergrößerung zur Quantifizierung des Tumorwachstums bestimmt. In der 10x Vergrößerung wurde der Tumor in acht Kreissegmente unterteilt und einzeln im Randbereich die Tumorstreuung, Zellmigration und Neoangiogenese untersucht (siehe Abbildung 9). In den Beobachtungsfeldern I-VIII wurde der Abstand (in μm) der migrierten Tumorzellen zum Tumorrand gemessen. Hämatome bzw. petechiale Einblutungen, die sich durch erhöhte Gefäßpermeabilität im Laufe des Tumorwachstums bei Gefäßaussprossung entwickelten, zeigten sich als schwarze, teils konfluierende Punkte. Falls ein Hämatom vorhanden war, wurde dies vermerkt (Hämatom vorhanden = 1; Hämatom nicht vorhanden = 0)

Mit dem 20x Wasserimmersionsobjektiv wurde in den Feldern 1b-8b (siehe Abbildung 9) die Gefäßdichte, der Gefäßdurchmesser mit fünf repräsentativen Gefäßdurchmessern (in μm) und die Gefäßdichte in (cm/cm^2) bestimmt. Die Randfelder 1a-8a dienten zur Analyse der migrierten Zellen.

3.8. Histologie/Immunhistochemie

Zur histologischen Aufarbeitung wurden am Ende des Versuches die Tiere mit einer Überdosis an Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland) getötet und anschließend die Tumore aus der Rückhautkammer entnommen und in zwei Teile geteilt. Die eine Hälfte der Tumoren wurde in Formalin fixiert (IHC Zinc fixativ, BD Pharmingen BD Biosciences) und in Paraffin eingebettet. Die andere Tumorthälfte wurde in flüssigen Stickstoff eingefroren. Dann wurden die Tumore in Tissue Freezing Medium (Jung) eingebettet und bei -80° aufbewahrt. Aus den in Formalin eingelegten und in Paraffinblöcken eingebetteten Tumorproben wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin nach der Standardmethode nach Mayer angefärbt. Anhand dieser Schnitte wurden die Tumormorphologie und Infiltrationstiefe der Tumorzellen bestimmt.

Als Proliferationsmarker diente das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) und als Apoptosemarker die gespaltene Caspase-3. Dazu wurden die Tumorteile in 3%-igem H₂O₂ und 2%-igem Ziegenerum inkubiert, um die endogene Peroxidase und die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Als primärer Antikörper für PCNA wurde monoklonaler Maus-anti-Pan-PCNA-IgG Antikörper (PC10 1:50; DakoCytomation, Hamburg Deutschland) und für Caspase-3 der polyklonale Kaninchen-anti-Maus-Caspase-3-Antikörper (ASP 175, 1:50; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde Ziegen anti-Maus-IgG und IgG der Ziege, welches gegen Kaninchen Immunglobulin gerichtet ist, verwendet. Dieser sekundäre Antikörper wurde mit Biotin gekoppelt und mit Streptavidin-Biotin-Komplex Peroxidase fixiert (1:200, LSAB 2 System HRP, DakoCytomation). 3,3'-Diaminobenzidine (DakoCytomation) wurden als Farbstoff verwendet. Die Präparate wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

Die in Tissue Freezing Medium (Jung) und bei -80°C kryokonservierte zweite Hälfte der Histologie-Probe wurde zur immunhistochemischen Darstellung des CXCR4-Rezeptors verwendet. Dazu wurden 5µm dicke Kryoschnitte angefertigt und für 5 Sekunden in 4°C Azeton und 10 Minuten in 4%igem Formaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte eine Blockierung mit 2%igem Eselserum. Dann folgte eine Inkubation mit polyklonalen Ziegen-anti-Maus-CXCR4 Antikörper (1:10, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland). Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-konjugierter Esel-anti-Ziegen-IgG-Antikörper (1:500, Amersham, Freiburg) verwendet. Als Farbstoff diente 3,3'-Diaminobenzidine (DakoCytomation), die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun.

Die Auswertung der histologischen Tumorschnitte erfolgte semiquantitativ mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Dabei wurde in 175-facher Vergrößerung ein High Power Field von 7 cm zu 8,5 cm auf dem Bildschirm festgelegt, und die Anzahl der angefärbten Zellen pro High Power Field ausgezählt. Es wurden pro histologischem Tumorschnitt 10 Felder ausgewertet.

3.9. Studiendesign

Die Versuchstiere (n=48) wurden in insgesamt sechs Gruppen zu je acht Tieren randomisiert (siehe Tabelle 1).

In allen Gruppen wurde zwei Tage vor Tumorimplantation die Rückenhautkammer präpariert. Nach Implantation der 1×10^5 CT26-GFP Tumorzellen in die Kammer wurde die erste Intravitalmikroskopie durchgeführt. Vier weitere folgten an Tag 5, 8, 11 und 14 Tage nach Tumorimplantation. In drei Gruppen wurde eine 70%-ige Leberresektion durchgeführt.

Die nicht leberesezierten Tiere wurden in drei Gruppen, in die KON Gruppe, die α -c-KIT Gruppe und die α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe eingeteilt. Den Tieren der Kontrollgruppe KON wurde ein isotypspezifischer Kontrollantikörper (rat IgG, monoklonal IgG, A95-1, Catalog nr.: 553985, BD Biosciences Pharmingen) alle zwei Tage ab dem Tag der Tumorzellimplantation verabreicht. Den Tieren der α -c-KIT Gruppe wurde ein c-KIT-Antikörper (rat anti-mouse anti- CD117 monoklonal antibody (c-KIT), PharMingen, ACK45, Catalog nr.:553867) an vier aufeinanderfolgenden Tage injiziert, beginnend vier Tage vor Tumorimplantation. Die α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe wurde ebenfalls nach dem gleichen Schema wie die α -c-KIT Gruppe mit anti-c-KIT-Antikörper vier Tage vorbehandelt. Ab Tag der Tumorimplantation wurde dieser Gruppe zusätzlich der anti-SDF-1-IgG Antikörper (monoklonal anti human/mouse CXCL12/SDF-1 antibody, R&D Systems MAB310) alle zwei Tage injiziert.

Die leberesezierten Tiere wurden auch in drei Gruppen eingeteilt (PHX Gruppe, PHX/ α -c-KIT Gruppe, PHX/ α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe) und nach dem gleichen Antikörper Schema behandelt. Allerdings wurde bei allen Tieren dieser Gruppen eine 70%-ige Leberresektion (PHX) am Tag der Tumorimplantation durchgeführt.

Die Antikörper wurden immer intraperitoneal injiziert. Dazu wurden pro Antikörpergabe jeweils 20 μ g in 40 μ l PBS gelöst (=1 mg/Kg KG).

Die Dauer des in vivo-Versuches betrug 14 Tage ab dem Tag der Tumorimplantation und wurde mit der Entnahme der histologischen Präparate beendet.

Tabelle 1: Tabelle der Versuchsgruppen

Angegeben ist das Schema der Antikörper-Applikation der jeweiligen Gruppen mit oder ohne Leberresektion (PHX)

Gruppe	PHX	Kontroll-IgG	anti-c-KIT	anti-SDF-1	Antikörpergabe
KON	-	+	-	-	Kontroll-IgG: Tag 0 ,2 ,4 ,6 ,8 ,10, 12 nach Tumorimplantation
α -c-KIT	-	-	+	-	anti-c-KIT: Tag -4, -3, -2, -1 vor Tumorimplantation
α -c-KIT/ α -SDF-1	-	-	+	+	anti-c-KIT: Tag -4, -3, -2, -1 vor Tumorimplantation und anti-SDF-1: Tag 0 ,2 ,4 ,6 ,8 ,10, 12 nach Tumorimplantation
PHX	+	+	-	-	Kontroll-IgG: Tag 0 ,2 ,4 ,6 ,8 ,10, 12 nach Tumorimplantation
PHX/ α -c-KIT	+	-	+	-	anti-c-KIT: Tag -4, -3, -2, -1 vor Tumorimplantation
PHX/ α -c-KIT/ α -SDF-1	+	-	+	+	anti-c-KIT: Tag -4, -3, -2, -1 vor Tumorimplantation und anti-SDF-1: Tag 0 ,2 ,4 ,6 ,8 ,10, 12 nach Tumorimplantation

KON Gruppe und PHX Gruppe

Den Tieren der KON und PHX Gruppe wurde der Kontrollantikörper intraperitoneal injiziert (jeweils 20 μ g in 40 μ l PBS). Begonnen wurden die Injektionen am Tag der Tumorimplantation in die Rückenhautkammer. Sie erfolgten alle zwei Tage, so dass den Tieren insgesamt sieben Injektionen verabreicht wurden. Insgesamt wurden die Tiere mit einer Gesamtdosis von 7 mg/kg Körpergewicht (KG) Kontroll-IgG über den gesamten Versuchszeitraum behandelt. Eine Intravitalmikroskopie wurde direkt am Tag der Tumorimplantation, sowie an den Tagen 5, 8, 11 und 14 nach Tumorimplantation durchgeführt (siehe Abbildung 10).

Die Tiere der PHX Gruppe wurden am Tag der Tumorimplantation zu 70% leberreseziert.

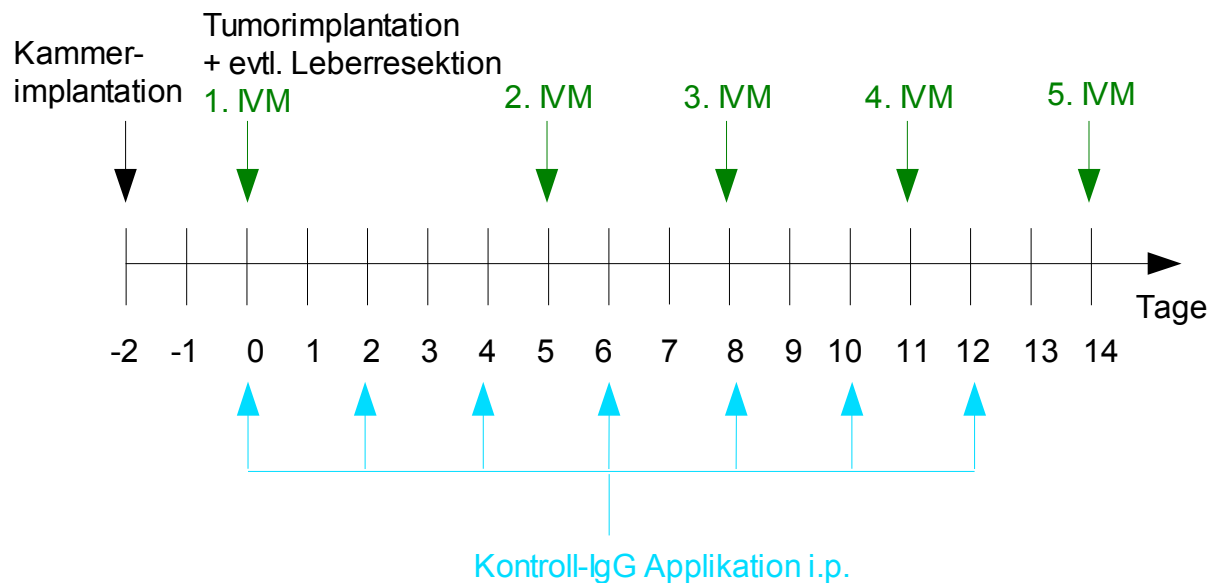


Abbildung 10: Versuchsablauf der KON und PHX Gruppe

Der Kontroll-IgG-Antikörper wurde von Tag 0 bis Tag 12 alle zwei Tage verabreicht, die Kammerpräparation erfolgte an Tag -2 und die Tumorimplantation an Tag 0. In der PHX Gruppe wurde an Tag 0 zusätzlich noch eine 70% Leberresektion durchgeführt. Intravitalmikroskopische Untersuchungen erfolgten an den Tagen 0, 5, 8, 11 und 14.

α -c-KIT Gruppe und PHX/ α -c-KIT Gruppe

Die Tiere der α -c-KIT und PHX/ α -c-KIT Gruppe wurden über einen Zeitraum von vier Tagen mit dem c-KIT-Antikörper vorbehandelt. Es wurde eine Gesamtmenge von 4 mg/kg KG verabreicht (je 20 μ g in 40 μ l PBS pro Tag). Zwei Tage nach Beginn der c-KIT Antikörpergabe wurde die Rückenhautkammer präpariert. 48 Stunden später erfolgte die Tumorimplantation in die Kammer und eine 70%-ige Leberresektion in der PHX/ α -c-KIT Gruppe. Die erste IVM wurde direkt nach Tumorimplantation durchgeführt, weitere folgten an den Tagen 5, 8, 11 und 14 nach Tumorimplantation. Ab dem Tag der Tumorimplantation erfolgte keine weitere Antikörpergabe (siehe Abbildung 11).

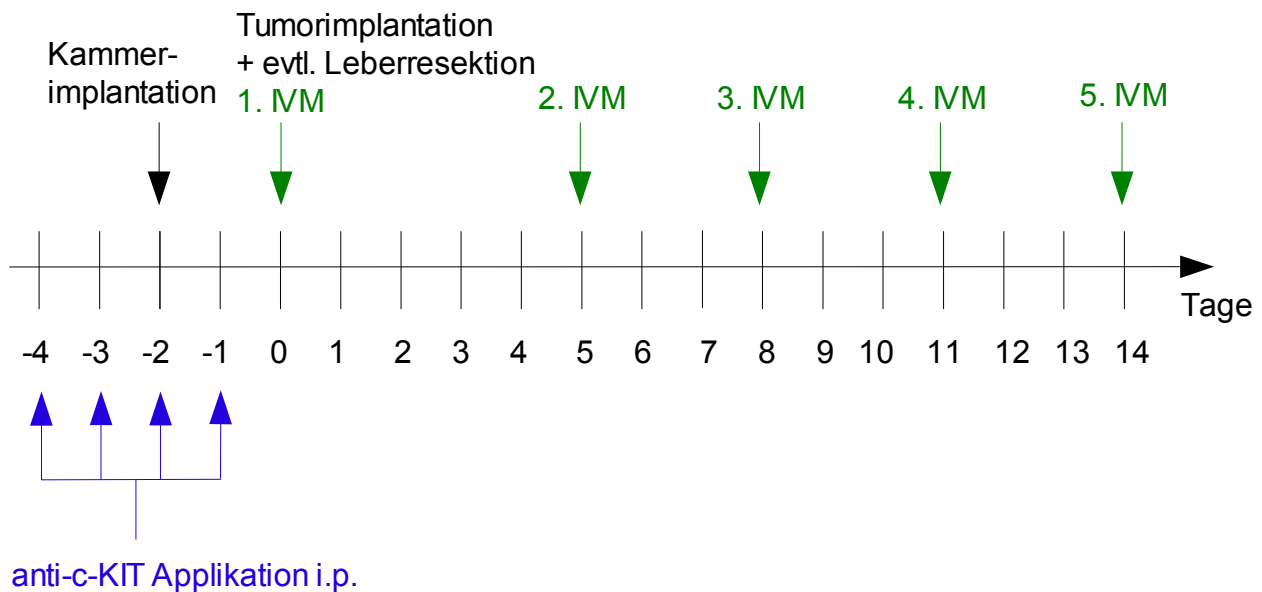


Abbildung 11: Versuchsablauf der α -c-KIT Gruppe und der PHX/ α -c-KIT Gruppe

anti-c-KIT wurde täglich von Tag -4 bis Tag -1 appliziert, die Kammerpräparation erfolgte an Tag -2 und die Tumorimplantation an Tag 0. In der PHX/ α -c-KIT Gruppe wurde an Tag 0 zusätzlich noch eine 70% Leberresektion durchgeführt. Intravitalmikroskopische Untersuchungen erfolgten an den Tagen 0, 5, 8, 11 und 14.

α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe und PHX/ α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe

Den Tieren der α -c-KIT/ α -SDF-1 und der PHX/ α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe wurden zwei Antikörper verabreicht, der c-KIT Antikörper und der anti-SDF-1 Antikörper. Genauso wie in der α -c-KIT Gruppe und in der PHX/ α -c-KIT Gruppe wurden die Tiere mit dem c-KIT Antikörper vier Tage vorbehandelt. Die Tiere der PHX/ α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe wurden 70% leberreseziert. Ab dem Tag der Tumorimplantation wurden die Mäuse mit anti-SDF-1 weiterbehandelt. Der Antikörper wurde alle zwei Tage intraperitoneal appliziert (je 20 μ g in 40 μ l PBS pro Tag). Den Tieren wurde somit insgesamt eine Gesamtdosis von 4 mg/kg KG c-KIT Antikörper und eine Menge von 7mg/kg KG anti-SDF-1 verabreicht. Die Intravitalmikroskopie wurde genauso wie in den anderen Gruppen an den Tagen 0, 5, 8, 11 und 14 durchgeführt (siehe Abbildung 12).

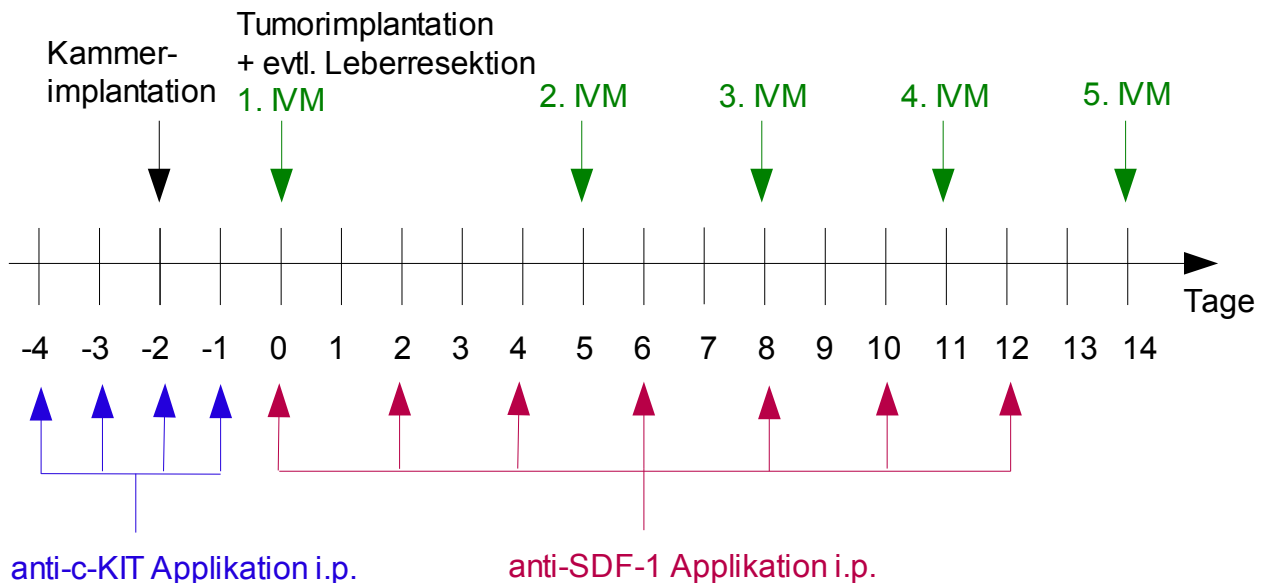


Abbildung 12: Versuchsablauf der α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe und der PHX/ α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe

Die anti-c-KIT Gabe erfolgte von Tag -4 bis Tag -1, die anti-SDF-1-Gabe von Tag 0 bis Tag 12 alle zwei Tage, die Kammerimplantation wurde an Tag -2 und die Tumorimplantation an Tag 0 durchgeführt. In der PHX/ α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe erfolgte an Tag 0 zusätzlich noch eine 70% Leberresektion. Intravitalmikroskopische Untersuchungen wurden an den Tag 0, 5, 8, 11 und 14 durchgeführt.

3.10. Western Blot Analyse

Um die Proteinexpression im Tumor zu untersuchen, wurden zusätzliche Western Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurde 12 zusätzlichen Tieren CT26-GFP Zellen in die Rückenhautkammer implantiert und die Tiere in drei Gruppen zu je vier Tieren eingeteilt. Die Tiere wurden wie die Tiere der KON, α -c-KIT und α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe behandelt (siehe Studiendesign).

Zur Proteinextraktion und Western Blot Analyse von SDF-1 und VEGF wurde der Tumor am fünften Tag nach Tumorimplantation komplett aus der Kammer entfernt. Die Gewebeproben wurden separat in Lyse Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton-X 100, 0,02 mM NaN_3 , 0,2 mM PMSF) und Protease Inhibitor in Verdünnung 1:100 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) homogenisiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde als reiner Proteinextrakt gesammelt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Lowry Assays mit bovinem Serumalbumin als Kontrolle bestimmt. Pro Linie wurden 30 μ g Protein diskontinuierlich in

Natriumdodecylsulfatpolyacrylamid Gel (10% SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend auf eine Polyvinylidendifluorid Membran aufgebracht (0,2 µm, BioRad, München, Deutschland). Nachdem die unspezifischen Bindungsstellen blockiert wurden, wurden die Membranen zwei Stunden mit einem polyklonalen anti-VEGF Antikörper des Kaninchens (sc-152, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), einem polyklonalen anti-Maus CXCR-4 Antikörper des Kaninchens (ab2074, 1:200, Abcam Cambridge, Großbritannien) und mit einem polyklonalen anti-Maus SDF-1 Antikörper des Kaninchens (ab25117, 1:200 Abcam) inkubiert. Dieses Gemisch wurde anschließend mit dem entsprechenden sekundären Oxidasekonjugat-Antikörper für eineinhalb Stunden inkubiert (1:5000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland und R&D Systems Wiesbaden, Deutschland). Zur Veranschaulichung der Protein Expression wurde ein blaulichtsensitiver Autoradiographiefilm mit luminolverstärkter Chemilumineszenz (ECL, Amersham) belichtet und auf den Membranen abgebildet (Hyperfilm ECL, Amersham). Die Signale wurden densitometrisch bestimmt (BioRad, Gel-Dokumentationssystem) und entsprechend der β -actin Expression normiert.

3.11. Statistische Auswertung

Die Daten sind als Mittelwert und Standardfehler (SEM) angegeben. Zur Analyse der Daten wurde SigmaStat (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Nach Überprüfung auf Normalverteilung wurde zum Vergleich der Gruppen die eindimensionale Varianzanalyse (ANOVA) benutzt. Dann wurde zwischen den einzelnen Gruppen mit dem post-hoc Test unter Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni unterschieden. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Tumorwachstum unter Blockade von c-KIT und SDF-1

Der Allgemeinzustand aller Tiere wurde durch die Kammerpräparation und die Tumorimplantation nicht beeinträchtigt. Alle Tiere zeigten eine komplikationslose postoperative Erholung und tolerierten die intravitale Fluoreszenzmikroskopie während der 14-tägigen Untersuchungsperiode ohne Schwierigkeiten.

Die CT26-GFP Zellen wuchsen in der Rückenhautkammer zu 100% an. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zeigte ein progressives Tumorwachstum über den 14-tägigen Beobachtungszeitraum in allen Gruppen.

Aus den Tumorgößen der einzelnen Kontrolltage (d0, d5, d8, d11, d14) wurde das Tumorwachstum als Differenz aus der Tumorfläche zu derjenigen an Tag 0 (in [mm²]) bestimmt (siehe Abbildung 13). Im Gruppenvergleich zeigte die α -c-KIT Gruppe ein signifikant ($p < 0,05$) stärkeres Tumorwachstum als die KON Gruppe an Tag 5, 8 und 11. An Tag 14 konnte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der α -c-KIT Gruppe ($4,25 \pm 0,58 \text{ mm}^2$) und der KON Gruppe ($3,03 \pm 0,26 \text{ mm}^2$) erzielt werden. Das Tumorwachstum der α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe hingegen zeigte keinen signifikanten Unterschied zur KON Gruppe. Der Vergleich der α -c-KIT Gruppe mit der α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe ergab an allen Untersuchungstagen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Bis Tag 14 waren die Tumoren in der α -c-KIT Gruppe um $4,25 \pm 0,58 \text{ mm}^2$ gewachsen und in der α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe nur um $2,62 \pm 0,21 \text{ mm}^2$. Nach anti-c-KIT Gabe kam es zu einer signifikanten Stimulation des Tumorwachstums und einem verstärkten Anwachsen der Tumorzellen im Vergleich zur KON Gruppe. Dieser Effekt konnte durch die zusätzliche Applikation von anti-SDF-1 komplett kompensiert werden, so dass eine Gabe beider Antikörper zu einem ähnlichen Tumorwachstum führte wie in der KON Gruppe.

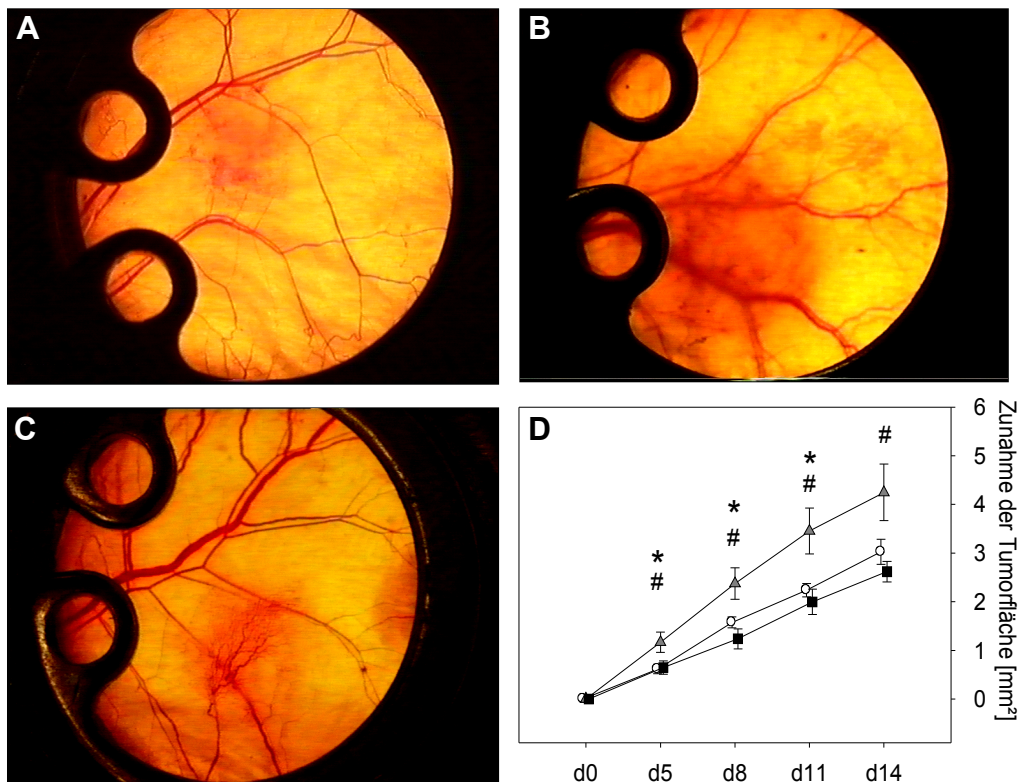


Abbildung 13: Verstärktes Tumorwachstum nach anti-c-KIT Applikation

Tumorwachstum der CT26-GFP Tumoren in der Rückenhautkammer. Repräsentative stereomikroskopische Aufnahmen eines 14 Tage alten Tumors der KON Gruppe (Bild A: KON, Tag 14), der α-c-KIT Gruppe (Bild B: α-c-KIT, Tag 14), und der α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe (Bild C: α-c-KIT/α-SDF-1, Tag 14). Die quantitative Analyse der Tumorgöße (Bild D) zeigt ein progressives Tumorwachstum in allen Gruppen über den Untersuchungszeitraum. Nach anti-c-KIT Vorbehandlung, war das Tumorwachstum signifikant verstärkt im Vergleich zur KON Gruppe. Die zusätzliche Neutralisierung von SDF-1 führt wieder zu einer Aufhebung des verstärkten Wachstums. Angaben: Mittelwert \pm SEM; # $p < 0,05$ vs. α-c-KIT/α-SDF-1; * $p < 0,05$ vs. KON; (KON = weiße Kreise, α-c-KIT = graue Dreiecke, α-c-KIT/α-SDF-1 = schwarze Quadrate).

4.2. Tumorangiogenese unter Blockade von c-KIT und SDF-1

Um die Bildung neuer Blutgefäße zu quantifizieren wurde bei jeder Intravitalmikroskopie die Tumorfläche in fünf Felder eingeteilt. Die Anzahl der Felder in denen Neoangiogenese stattgefunden hatte, wurde dokumentiert. Bei den Kontrolltieren wurden neu gebildete Gefäße an Tag 5 nach Tumorimplantation in 50 % der untersuchten Felder beobachtet (siehe Abbildung 14). Bereits an Tag 8, wurde die Angiogenese nahezu in allen Feldern registriert. Durch Gabe des anti-c-KIT-Antikörpers wurde die Angiogenese im Vergleich zur KON Gruppe nicht verändert. Die Applikation beider Antikörper, anti-c-KIT und anti-SDF-1, führte zu einer signifikanten Verzögerung der Angiogenese, die an Tag 8 nur in 50% und an Tag 11 in ca. 70 % der Felder zu beobachten war ($p < 0.05$).

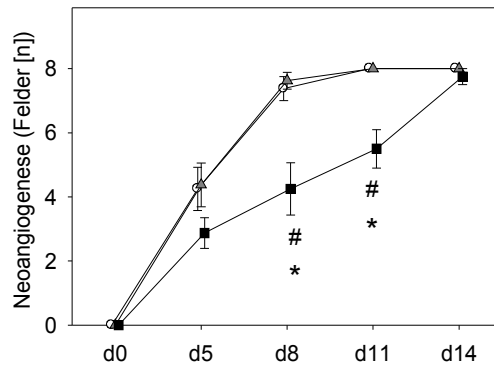


Abbildung 14: Verzögerte Neoangiogenese nach anti-c-KIT und anti-SDF-1 Applikation

Semiquantitative Analyse des Ausmaßes der Angiogenese innerhalb von CT26-GFP Tumoren. Die Tiere wurden nur mit anti-c-KIT oder zusätzlich auch noch mit anti-SDF-1 behandelt. Tiere, denen Kontroll-IgG verabreicht wurde, dienten als KON Gruppe. In der KON und der α -c-KIT Gruppe zeigte sich in ca 50% der untersuchten Felder 5 Tage nach Tumorimplantation eine Sprossung neuer Gefäße. Ab Tag 8 war nahezu der gesamte Tumor in diesen beiden Gruppen neovaskularisiert. Die Kombination von anti-c-KIT und anti-SDF-1 in der α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe führte zu einer signifikanten Verzögerung der Angiogenese. Lediglich 50-70% der untersuchten Felder waren an Tag 8 bis Tag 11 neovaskularisiert. Innerhalb dieser Gruppe konnte die Angiogenese in allen Feldern erst ab Tag 14 beobachtet werden. Angaben: Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. KON; # $p < 0,05$ vs. α -c-KIT; (KON = weiße Kreise, α -c-KIT = graue Dreiecke, α -c-KIT/ α -SDF-1 = schwarze Quadrate).

Die Dichte der Gefäße (in $[cm/cm^2]$) wurde in allen untersuchten Feldern, sowohl am Tumorrand als auch im Tumorzentrum, quantitativ analysiert. Das Gefäßnetzwerk der Tumoren besteht charakteristischer Weise aus irregulär geformten und chaotisch angeordneten Gefäßen (Abbildung 15 A-B). Bei der Gefäßdichte der Tumoren in der α -c-KIT Gruppe konnte im Vergleich zur KON Gruppe kein Unterschied beobachtet werden. Die zusätzliche Applikation von anti-SDF-1 führte ab Tag 8 zu einer signifikanten Verminderung der Gefäßdichte innerhalb des Tumorzentrums im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen (Abbildung 15 D). Die quantitative Untersuchung der Gefäßdichte am Tumorrand zeigte vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 15 C). Die funktionellen Gefäßdichten des Tumorrandes und des Tumorzentrums zeigten keinen signifikanten Unterschied in den jeweiligen Gruppen. Die Gefäßdichte am Tumorrand lag an Tag 14 in der KON Gruppe bei $401,65 \pm 13,30 \text{ cm/cm}^2$ im Vergleich zur α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe mit $352,88 \pm 46,33 \text{ cm/cm}^2$.

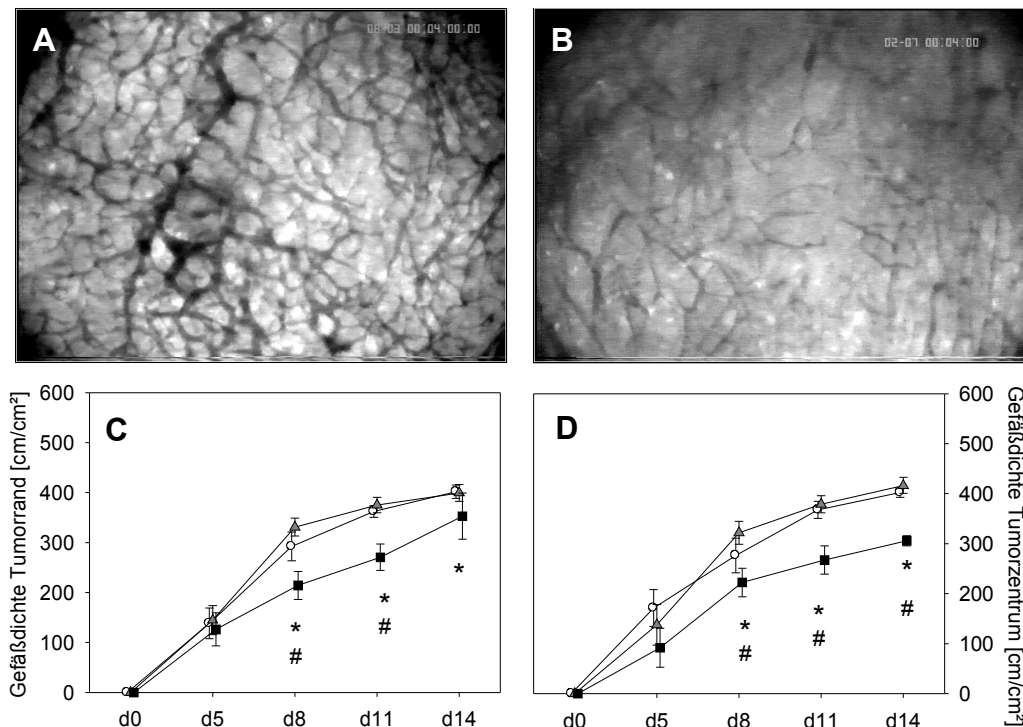


Abbildung 15: Gefäßdichte und Gefäßstruktur im Tumorrand und im Tumorzentrum

Fluoreszenzmikroskopische Bilder zeigen das Netzwerk der chaotisch arrangierten Gefäße im Tumorzentrum der α-c-KIT Gruppe (Bild A: α-c-KIT, Tag 11) und der α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe (Bild B: α-c-KIT/α-SDF-1, Tag 11) an Tag 11 nach der Tumorzellimplantation. Die quantitative Analyse der funktionellen Gefäßdichte zeigte eine signifikante Inhibierung der Tumor-Neovaskularisierung im Tumorzentrum (Abbildung D) in der α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe, im Vergleich zur KON Gruppe. Die alleinige Behandlung mit anti-c-KIT-Antikörper führte nicht zu einem signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Neovaskularisierung. Die quantitative Analyse der funktionellen Gefäßdichte am Tumorrand (Abbildung C) zeigte eine signifikante Inhibierung der Tumor-Neovaskularisierung in der α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe, im Vergleich zur KON Gruppe ab Tag 8. Die alleinige Behandlung mit anti-c-KIT -Antikörper führte nicht zu einem signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Neovaskularisierung. Angaben: Mittelwert ± SEM; *p<0,05 vs. KON; #p<0,05 vs. α-c-KIT; (KON = weiße Kreise, α-c-KIT = graue Dreiecke, α-c-KIT/α-SDF-1 = schwarze Quadrate).

Der Durchmesser der Tumormikrogefäße (in [µm]) wurde sowohl am Tumorrand als auch im Tumorzentrum bestimmt (siehe Abbildung 16). Pro Intravitalmikroskopie und pro Tier wurden je 40 repräsentative Gefäßdurchmesser am Tumorrand und 20 Durchmesser im Tumorzentrum gemessen. Der Gruppenvergleich zeigte bezüglich des Gefäßdurchmessers am Tumorrand (siehe Abbildung 16 A) allerdings keine signifikanten Unterschiede. Der Durchmesser am Tumorrand betrug an Tag 5 in der KON Gruppe $12,42 \pm 0,53 \mu\text{m}$. Während des 14-tägigen Beobachtungszeitraums kam es zu einer leichten Verbreiterung des Gefäßdurchmessers in allen Gruppen bis Tag 11. Die Gefäßdurchmesser zeigten an Tag 14 im Tumorzentrum in der α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe mit $12,89 \pm 0,67 \mu\text{m}$ eine weniger stark ausgeprägte Gefäßdilatation als die KON Gruppe mit $16,86 \pm$

1,10 μm (siehe Abbildung 16 B). Diese Beobachtung war signifikant für die Gefäße im Tumorzentrum im Vergleich zur KON und zur α -c-KIT Gruppe.

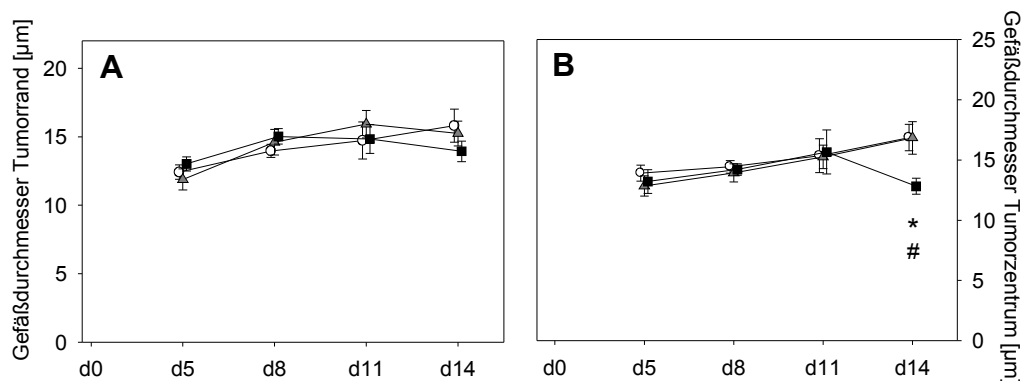


Abbildung 16: Gefäßdurchmesser am Tumorrand und im Tumorzentrum

Die quantitative Analyse der Gefäßdurchmesser zeigte keine signifikanten Unterschiede am Tumorrand (Abbildung A) der α -c-KIT Gruppe zur KON Gruppe oder zur α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum. Der Gefäßdurchmesser im Tumorzentrum (Abbildung B) wies bis Tag 11 nach Tumorimplantation ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf. Nur an Tag 14 zeigte die α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe einen signifikant geringeren Gefäßdurchmesser im Tumorzentrum als die anderen beiden Gruppen. Angaben: Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. KON; # $p < 0,05$ vs. α -c-KIT; (KON = weiße Kreise, α -c-KIT = graue Dreiecke, α -c-KIT/ α -SDF-1 = schwarze Quadrate).

Als Maß für die Gefäßdurchlässigkeit wurde die Bildung petechialer Einblutungen ins Gewebe und konfluierende Hämatome herangezogen. Eine Blutung im untersuchten Tumorfeld in der 10x Vergrößerung wurde mit dem Wert 1 dokumentiert. Falls keine Blutung vorhanden war, wurde dies mit dem Wert 0 definiert. Die Werte der acht Felder eines Tumors wurden addiert, diese Summe durch acht dividiert. Mikroblutungen konnten in allen Tumoren nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17). Am 5. Tag nach Tumorimplantation wurden in den untersuchten Feldern am Tumorrand in der KON Gruppe in ca. 6% Blutungen beobachtet, wohingegen in der α -c-KIT Gruppe bereits in 20% Blutungen vorhanden waren (siehe Abbildung 17 A). Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich in der α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe zu 30% Blutungen in den untersuchten Feldern am Tumorrand. Ab dem 8. Tag waren die Blutungen zu 15-20 % in der KON Gruppe, zu ca. 30% in der α -c-KIT Gruppe und zu 35-40% in der α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe am Tumorrand vorhanden. Bei Vergleich der drei Gruppen konnte auf Grund der hohen Standardabweichungen keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

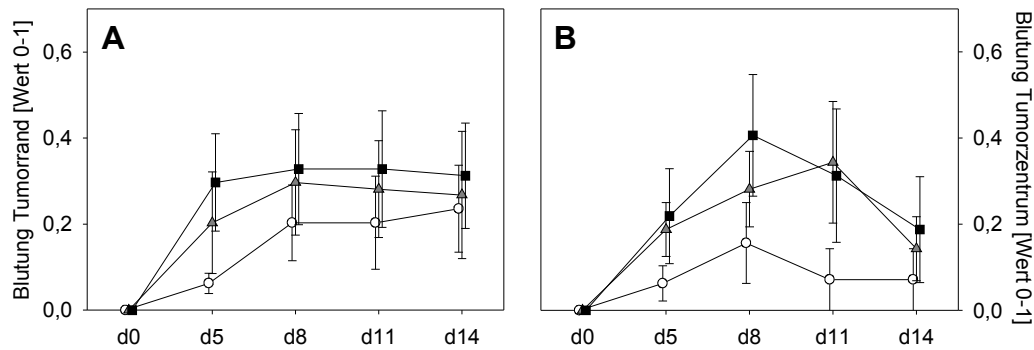


Abbildung 17: Analyse petechialer Blutungen am Tumorrand und im Tumorzentrum

Die quantitative Analyse der petechialen Blutungen zeigte sowohl am Tumorrand (Abbildung A) als auch im Tumorzentrum (Abbildung B) die gleiche Tendenz: Über den gesamten Untersuchungszeitraum führte die Applikation des c-KIT-Antikörpers zu einer Zunahme der petechialen Blutungen im Vergleich zur KON Gruppe. Diese Blutungen wurden durch die zusätzliche Gabe von anti-SDF-1 in der α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe weiter verstärkt. Allerdings konnte keine Signifikanz auf Grund der hohen Standardabweichungen im Gruppenvergleich erreicht werden. Angaben: Mittelwert \pm SEM; (KON = weiße Kreise, α-c-KIT = graue Dreiecke, α-c-KIT/α-SDF-1 = schwarze Quadrate).

4.3. Tumorzell-Migration und -Infiltration unter c-KIT und SDF-1 Blockade

Die Migrationsdistanz der Tumorzellen in das gesunde Gewebe wurde vom Tumorrand aus in μm gemessen. Die Anzahl der migrierten Zellen, die leicht an ihren pseudopodienartigen Ausläufern erkannt werden konnte, wurde bestimmt.

Beginnend ab dem 5. Tag nach Tumorimplantation konnte in allen Tumoren eine Migration bis zum Ende des Beobachtungszeitraums festgestellt werden (siehe Abbildung 18). Die Zahl der migrierten Tumorzellen lag zwischen 20 und 25 pro repräsentativem Untersuchungsfeld während des gesamten Untersuchungszeitraums (siehe Abbildung 18 B). An Tag 14 nach Tumorimplantation waren in der α-c-KIT Gruppe $24,0 \pm 1,3$ Zellen pro Untersuchungsfeld migriert, in der KON Gruppe waren es $20,8 \pm 1,7$ Zellen, und in der α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe waren es zu diesem Zeitpunkt $21,2 \pm 1,3$ Zellen. Der Abstand der migrierten Zellen vom Tumorrand nahm kontinuierlich mit dem Tumorzellwachstum in allen drei Gruppen zu, zeigte aber keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich (siehe Abbildung 18 A). An Tag 5 nach Tumorimplantation hatten die Tumorzellen in der α-c-KIT Gruppe eine Strecke von $292 \pm 16 \mu\text{m}$ zurückgelegt, an Tag 14 bereits $439 \pm 32 \mu\text{m}$. In der α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe waren es $309 \pm 51 \mu\text{m}$ an Tag 5 und $459 \pm 59 \mu\text{m}$ an Tag 14. Die Zellen der KON Gruppe migrierten in vergleichbarer Weise (Tag 5: $276 \pm 16 \mu\text{m}$; Tag 14: $422 \pm 22 \mu\text{m}$).

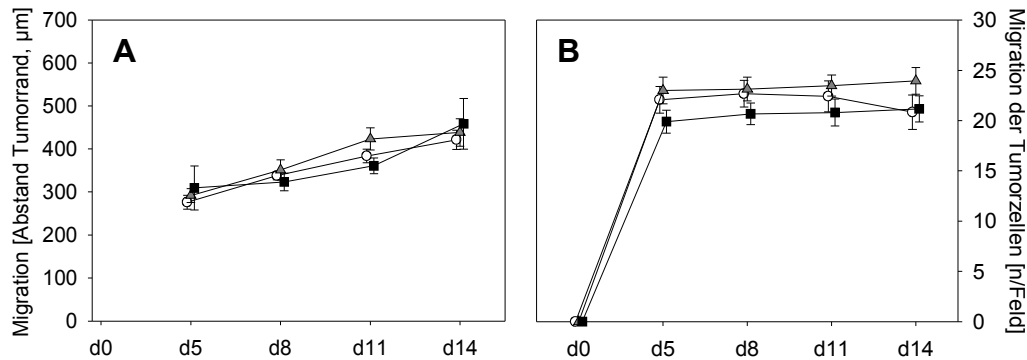


Abbildung 18: Migrationsweite und Anzahl der migrierten Tumorzellen

Die Tumorzellen migrierten vom Tumorrand aus kontinuierlich über den gesamten Untersuchungszeitraum (Abbildung A, Migrationsweite). Allerdings konnte im Gruppenvergleich keine Signifikanz zwischen den Gruppen dargestellt werden. Die Anzahl der migrierten Tumorzellen war am 5. Tag nach Tumorzellimplantation in allen Gruppen relativ konstant geblieben über den gesamten Untersuchungszeitraum, bei einer Zahl zwischen 20-25 Zellen pro Untersuchungsgebiet (Abbildung B). Angaben: Mittelwert \pm SEM; (KON = weiße Kreise, α -c-KIT = graue Dreiecke, α -c-KIT/ α -SDF-1 = schwarze Quadrate).

Die muskuläre Infiltration wurde an Hand der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Tumorschnitte untersucht. Es zeigte sich ein solides Tumorstadium in allen Gruppen. Die Zeichen eines malignen Tumorstadiums, wie die Invasion der Tumorzellen in gesundes Nachbargewebe konnte in jeder Gruppe nachgewiesen werden. Die quantitative Analyse der Tumorzell-Invasion zeigte keine signifikant vergrößerte Tumorzellinfiltration bis in die Muskelschicht in der α -c-KIT Gruppe mit $70,72 \pm 5,10\%$ im Vergleich zur KON Gruppe mit $69,14 \pm 8,02\%$ ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu zeigten die Tumoren der Tiere, die zusätzlich mit anti-SDF-1 behandelt wurden, mit $17,50 \pm 5,95\%$ eine signifikante Reduktion der muskulären Infiltration im Vergleich zur α -c-KIT Gruppe (siehe Abbildung 19 A, B, E).

4.4. Tumorzellproliferation und -apoptose unter c-KIT und SDF-1 Blockade

Der Anteil der PCNA-positiven Zellen wurde prozentual zur Gesamtzellzahl bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die α -c-KIT Gruppe mit $60,8 \pm 0,8\%$ ($p < 0,001$) eine signifikant höhere Proliferationsrate aufwies als die α -KON Gruppe mit $46,9 \pm 3,1\%$ (siehe Abbildung 19 C, F). Die zusätzliche Gabe von anti-SDF-1 in der α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe führte mit $35,4 \pm 1,9\%$ zu signifikant weniger PCNA-positiven Zellen als in der KON und in der α -c-KIT Gruppe (siehe Abbildung 19 D, F).

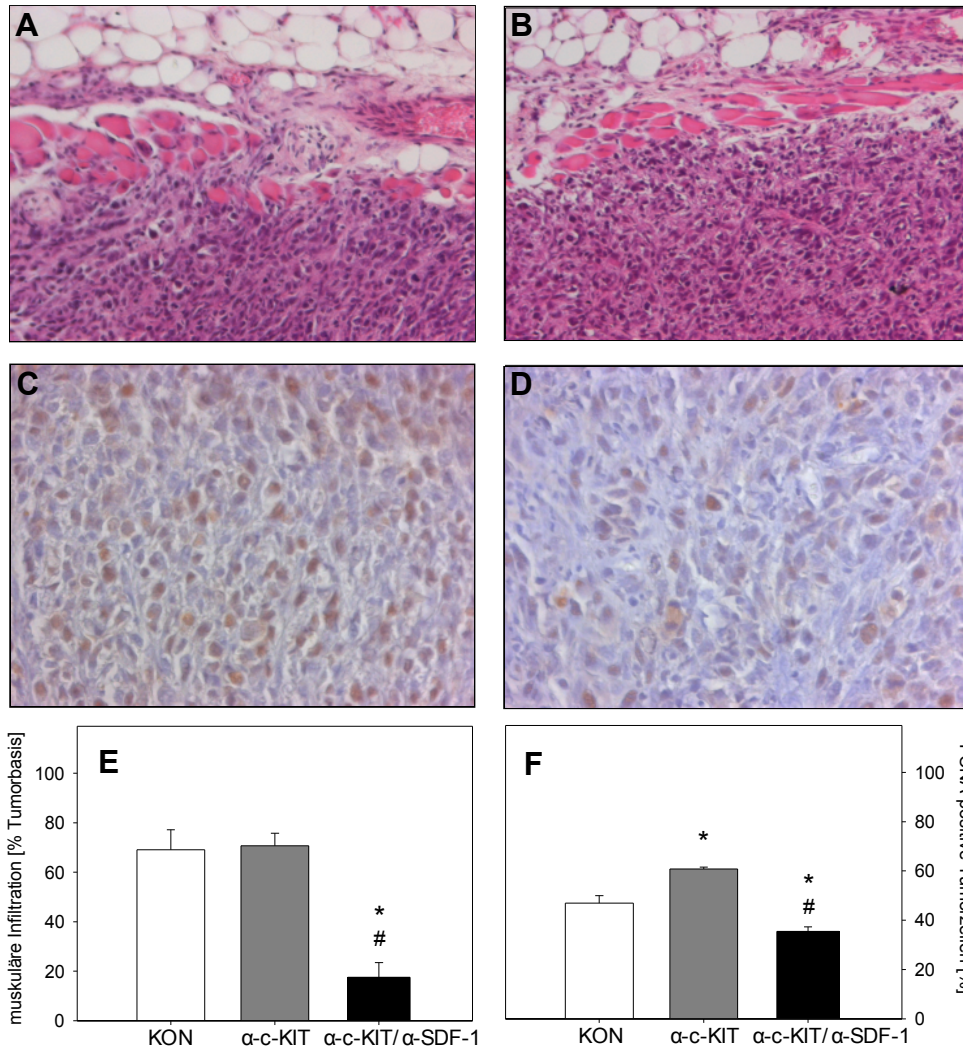


Abbildung 19: Tumorinfiltration in die Muskulatur in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und die Proliferationsrate der Tumorzellen dargestellt durch eine PCNA-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung der CT26-GFP Tumorzellen zeigte ein solides Tumorwachstum 14 Tage nach Tumorzellimplantation in der Rückenhautkammer. Die Abbildungen zeigen einen Durchbruch des Tumors in die darunterliegende Muskulatur nach Behandlung mit anti-c-KIT-Antikörper in der α -c-KIT Gruppe (Bild A: α -c-KIT) und keine Infiltration der Muskelschicht bei zusätzlicher Gabe von anti-SDF-1 in der α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe (Bild B: α -c-KIT/ α -SDF-1). Die quantitative Analyse der Tumorzellinvasion in die Muskelschicht ist prozentual auf die Gesamtlänge des Tumors angegeben (Abbildung E). Die Tiere der α -c-KIT Gruppe zeigten keine signifikant verstärkte Infiltration der Muskelschicht im Vergleich zur KON Gruppe. In der α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe hingegen kam es zu einer deutlichen Reduktion der muskulären Infiltration.

Die PCNA-Färbung zeigt die proliferierenden Tumorzellen am 14. Tag nach Tumorumplantation in die Rückenhautkammer. Die Tiere, die mit anti-c-KIT behandelt wurden (Bild C: α -c-KIT) zeigten eine stärkere Anfärbung als die Tiere, die sowohl mit anti-c-KIT als auch mit anti-SDF-1 (Bild D: α -c-KIT/ α -SDF-1) behandelt wurden. Die quantitative Analyse zeigte, dass die Vorbehandlung mit anti-c-KIT Antikörper die Proliferation der Tumorzellen signifikant im Vergleich zur KON Gruppe verstärkt (Abbildung F). Die zusätzliche Gabe des anti-SDF-1 Antikörpers führt zu einer deutlichen Verminderung der Proliferation im Vergleich zur KON Gruppe und auch im Vergleich zur α -c-KIT Gruppe. Angaben: Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. KON; # $p < 0,05$ vs. α -c-KIT.

Die Caspase-3-Färbung markiert Zellen in Apoptose. Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde prozentual zur Gesamtzellzahl angegeben (siehe Abbildung 20). 14 Tage nach Tumorzellimplantation war lediglich ein kleiner Anteil der gesamten Tumorzellen in den Untersuchungsfeldern Caspase-3 positiv. Von der Gesamtzahl der Tumorzellen, die sich auf $351,3 \pm 5,2$ Tumorzellen pro Untersuchungsfeld belief, waren in der KON Gruppe nur $0,73 \pm 0,13$ Caspase-3 positiv. In der α -c-KIT Gruppe reduzierte sich die Anzahl der apoptotischen Zellen. Bei der zusätzlichen Gabe von anti-SDF-1 kam es zu einer weiteren Absenkung der Caspase-3-positiven Zellen auf pro Beobachtungsfeld in der α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe ($p < 0,05$).

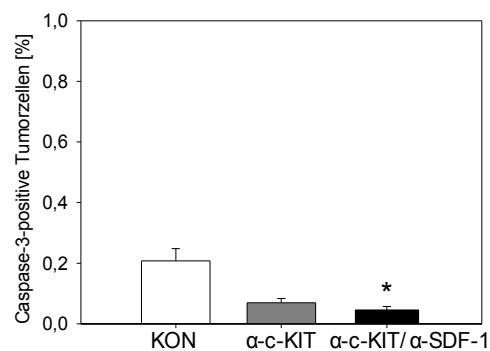


Abbildung 20: Apoptoserate der Tumorzellen dargestellt durch eine Caspase-3-Färbung

Die quantitative Analyse zeigt den prozentualen Anteil der Tumorzellen die an Tag 14 durch den Marker Caspase-3 angefärbt wurden und sich damit in Apoptose befinden. Die anti-c-KIT Antikörper Gabe führte zu einer Reduktion der apoptotischen Zellen, die allerdings nicht signifikant war. Die zusätzliche Gabe von anti-SDF-1 zu anti-c-KIT in der α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe führte zu einer weiteren Reduktion der Apoptoserate. Diese war im Vergleich zur KON Gruppe signifikant. Angaben: Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. KON.

4.5. Western Blot Analyse

Am 5. Tag nach der Tumorimplantation, zeigten die Tumore der α -c-KIT Gruppe einen signifikanten Anstieg der VEGF Expression im Vergleich zur KON Gruppe ($p < 0,05$ Abbildung 21 A). Die zusätzliche Gabe von anti-SDF-1 in der α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe ergab ebenfalls eine vermehrte VEGF Expression, die signifikant im Vergleich zur KON Gruppe war. Auch die CXCR4 Expression war am 5. Tag in der α -c-KIT Gruppe mit $4,70 \pm 0,19$ OD/mm² signifikant höher als in der KON Gruppe mit $2,74 \pm 0,17$ OD/mm² ($p < 0,05$ Abbildung 21 B). Die zusätzliche Blockade von SDF-1 führte nicht zu einer weiteren Verstärkung der CXCR4 Expression.

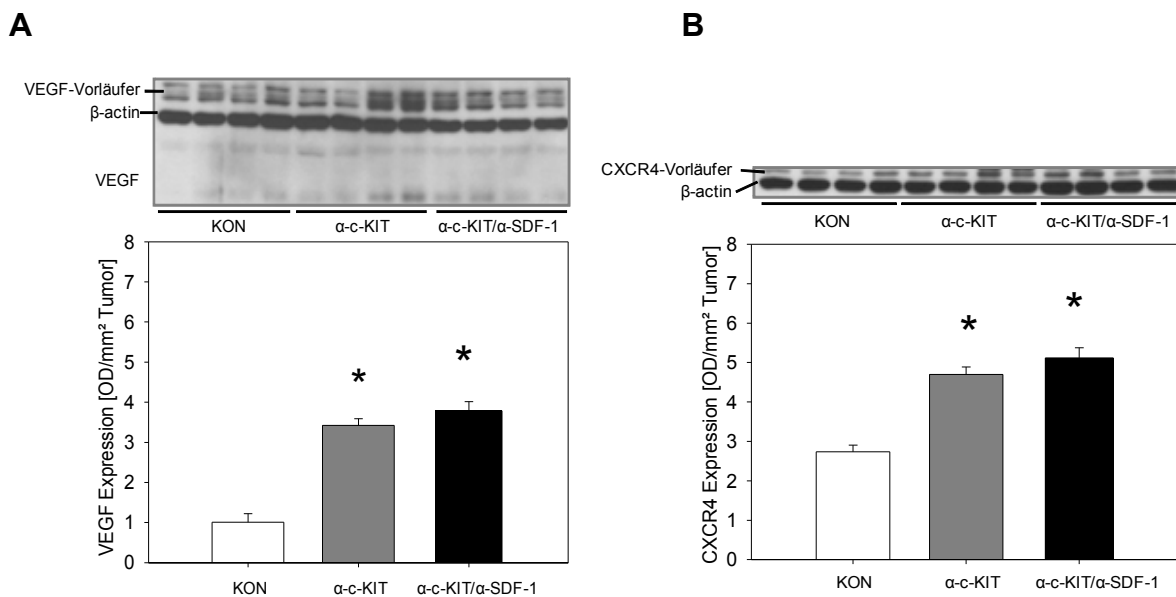


Abbildung 21: Western Blot der VEGF und CXCR4 Expression in CT26-GFP Tumoren, fünf Tage nach Tumorzell-Implantation

Die quantitative Analyse der VEGF Expression (Bild A) zeigt, dass die VEGF Expression nach anti-c-KIT Vorbehandlung signifikant höher ist, als in den Tieren der KON Gruppe. Eine zusätzliche Neutralisierung von SDF-1 in der α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe hatte keinen weiteren signifikanten Effekt auf die bereits erhöhte VEGF Expression. Die quantitative Analyse der CXCR4 Expression (Bild B) zeigt, dass CXCR4 nach anti-c-KIT Vorbehandlung signifikant höher exprimiert war, als in der KON Gruppe. Eine zusätzliche Blockade von SDF-1 in der α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe hatte keinen signifikanten Effekt auf die bereits erhöhte CXCR4 Expression. Angaben: Mittelwert ± SEM; *p<0,05 vs. KON.

4.6. Tumorwachstum nach Leberresektion unter Blockade von c-KIT und SDF-1

Die Tumorzellen der CT26-GFP Zellreihe wuchsen in der Rückenhautkammer zu 100% an. Bei allen Tieren konnte über den Untersuchungszeitraum eine konstante Zunahme der Tumorgöße beobachtet werden. Die Größe der Tumoren wurde an den Tagen 0, 5, 8, 11 und 14 bestimmt. Aus diesen Werten errechnete sich das Tumorwachstum als Differenz aus der Tumorfläche (siehe Abbildung 22) zu derjenigen an Tag 0 (in [mm²]). Die PHX/α-c-KIT Gruppe wies nach anti-c-KIT Applikation das stärkste Tumorwachstum auf. Die PHX Gruppe zeigte eine Größenzunahme von $2,76 \pm 0,19 \text{ mm}^2$, die PHX/α-c-KIT Gruppe eine Größenzunahme von $3,63 \pm 0,33 \text{ mm}^2$. Die PHX/α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe lag am Ende des Untersuchungszeitraumes auf etwa vergleichbarem Niveau wie die PHX Gruppe mit $2,76 \pm 0,19 \text{ mm}^2$. Der Vergleich der Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

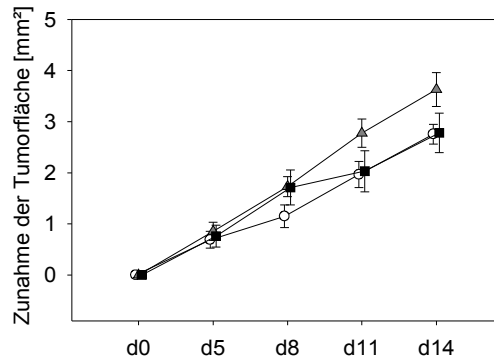


Abbildung 22: Tumorwachstum der Tumoren nach 70%-iger Leberresektion

Das Tumorwachstum der leberresezierten Tiere nach anti-c-KIT Applikation war ab dem 8. Tag nach Tumorimplantation gesteigert im Vergleich zur PHX Gruppe. Die PHX/α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe zeigte am 8. Tag ebenfalls ein gesteigertes Tumorwachstum, ab dem 11. Tag lag das Wachstum aber auf dem Niveau der KON Gruppe. Angaben: Mittelwert \pm SEM; (PHX = weiße Kreise, PHX/α-c-KIT = graue Dreiecke, PHX/α-c-KIT/α-SDF-1 = schwarze Quadrate).

4.7. Tumorangiogenese nach Leberresektion unter Blockade von c-KIT und SDF-1

Die Gabe des anti-c-KIT Antikörpers führte zu keiner Veränderung der Neoangiogenese im Vergleich zur PHX Gruppe (siehe Abbildung 23). Die zusätzliche Gabe von anti-SDF-1 hingegen senkte die Neoangiogenese von Tag 5 bis Tag 11 nach Tumorimplantation. Im Vergleich der Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. An Tag 5 nach Tumorimplantation konnte in der PHX/α-c-KIT Gruppe in $5,3 \pm 0,8$ der insgesamt acht Felder Neoangiogenese nachgewiesen werden. Das sind 65,6% der Gesamttumorfläche. Zu diesem Zeitpunkt wurde Angiogenese in der PHX Gruppe in $5,4 \pm 0,8$ Felder beobachtet, was 67,2% der Tumorfläche entspricht. In der PHX/α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe zeigte sich eine weniger stark ausgeprägte Neovaskularisierung mit $2,9 \pm 0,7$ neovaskularisierten Feldern, was 35,9% der Gesamttumorfläche ausmacht.

Die Gabe von anti-c-KIT und anti-SDF-1 führte allerdings zu einer signifikanten Reduktion der Gefäßdichte im Tumorzentrum und am Tumorrand ab Tag 5 nach Tumorimplantation im Vergleich zur PHX Gruppe (siehe Abbildung 24, Tabelle 2). Die alleinige Gabe von anti-c-KIT führte im Vergleich zur kombinierten Gabe beider Antikörper in der PHX/α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe zu einer verstärkten Gefäßdichte am Tumorrand und im Tumorzentrum. Der durchschnittliche Durchmesser der Gefäße am Tumorrand als auch im Tumorzentrum ergab keine aussagekräftigen Unterschiede im Gruppenvergleich (siehe Tabelle 2).

Die Auswertung petechialer Blutungen ergab bei den leberresezierten Tieren im Vergleich der Gruppen auf Grund der großen Standardabweichungen keinen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 25).

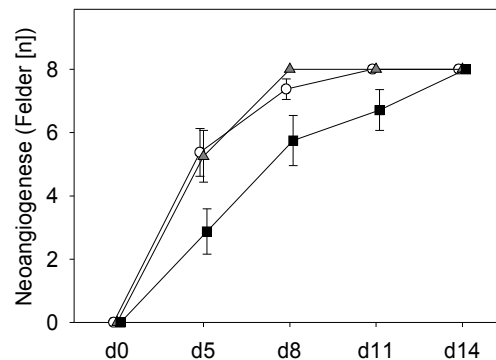


Abbildung 23: Neoangiogeneserate der leberresezierten Tiere

Die Neoangiogenese zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der PHX Gruppe und der PHX/α-c-KIT Gruppe. Die zusätzliche Gabe von anti-SDF-1 führte zu einer nicht signifikanten Reduktion der Angiogenese zwischen dem 5. und 11. Tag nach Tumorimplantation im Vergleich zur PHX Gruppe. Angaben: Mittelwert \pm SEM; (PHX Gruppe= weiße Kreise, PHX/α-c-KIT Gruppe= graue Dreiecke, PHX/α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe = schwarze Quadrate).

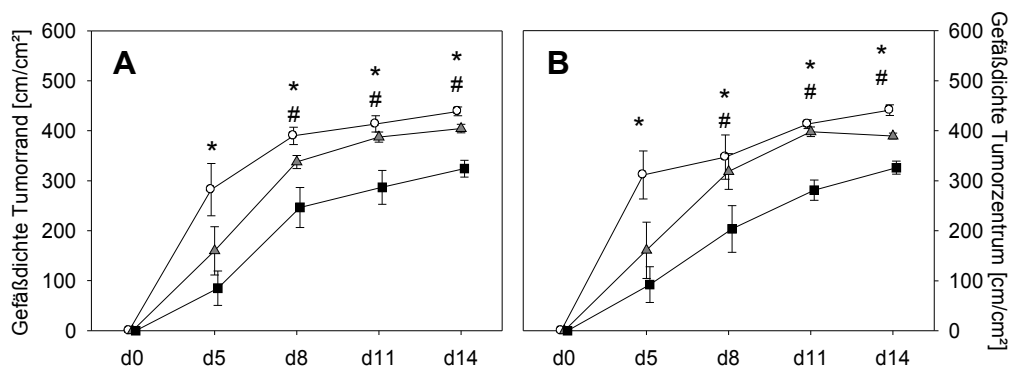


Abbildung 24: Gefäßdichte am Tumorrund und Tumorzentrum der leberresezierten Tiere

Die Gefäßdichte konnte durch die Gabe von anti-c-KIT ab dem 5. Tag nach Tumorimplantation im Vergleich zur PHX Gruppe gesenkt werden. Dieser Effekt war nicht signifikant. Die zusätzliche Gabe von anti-SDF-1 in der PHX/α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe verstärkte die Absenkung der Gefäßdichte im Vergleich zur PHX Gruppe ab Tag 5 signifikant. Angaben: Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. PHX; # $p < 0,05$ PHX/α-c-KIT; (PHX = weiße Kreise, PHX/α-c-KIT = graue Dreiecke, PHX/α-c-KIT/α-SDF-1 = schwarze Quadrate).

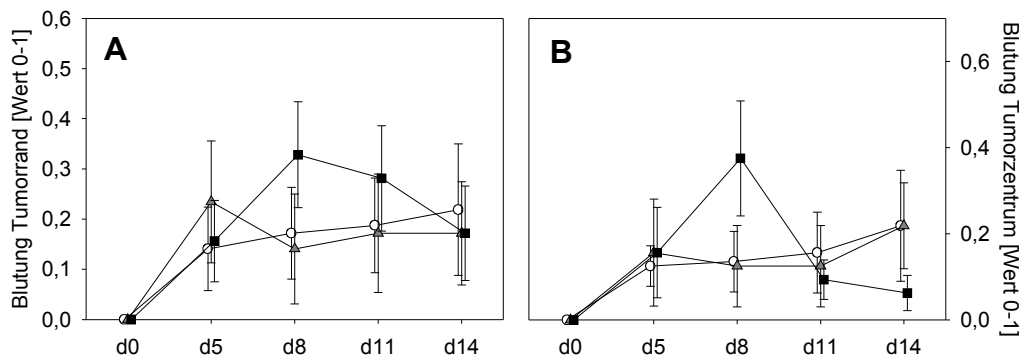


Abbildung 25: Petechiale Blutungen bei den leberresezierten Tieren

Vor allem am Tumorrand (Abbildung A) ist zu erkennen, dass es im Vergleich zur PHX Gruppe in der PHX/α-c-KIT/α-SDF-1 Gruppe zu einer Zunahme der petechialen Blutungen kam. Es konnten auf Grund der hohen Standardabweichungen allerdings keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden auch nicht im Vergleich mit der PHX/α-c-KIT Gruppe oder bei Auswertung der petechialen Blutungen im Tumorzentrum (Abbildung B). Angaben: Mittelwert ± SEM; (PHX = weiße Kreise, PHX/α-c-KIT = graue Dreiecke, PHX/α-c-KIT/α-SDF-1 = schwarze Quadrate).

Tabelle 2: Gefäßdurchmesser am Tumorrand und Tumorzentrum der leberresezierten Tiere

Die Angaben der Gefäßdurchmesser sind in µm. Angaben: Mittelwerte ± SEM; #p<0.05 vs. PHX/α-c-KIT.

Gefäßdurchmesser Tumorrand

Zeitpunkt	PHX	PHX/α-c-KIT	PHX/α-c-KIT/α-SDF-1
d5	12,69 ± 0,17	14,63 ± 1,48	12,00 ± 0,17 [#]
d8	14,39 ± 0,47	14,30 ± 1,46	13,77 ± 0,49
d11	14,32 ± 1,03	16,41 ± 0,80	15,59 ± 0,92
d14	14,24 ± 0,84	15,33 ± 1,10	13,31 ± 0,7

Gefäßdurchmesser Tumorzentrum

Zeitpunkt	PHX	PHX/α-c-KIT	PHX/α-c-KIT/α-SDF-1
d5	13,01 ± 0,29	15,73 ± 2,76	12,40 ± 0,84
d8	14,10 ± 0,71	14,01 ± 0,96	12,62 ± 0,39
d11	15,54 ± 1,34	16,87 ± 1,16	13,49 ± 0,46
d14	14,77 ± 0,85	19,60 ± 2,44	13,69 ± 0,78

4.8. Tumorzellmigration und – infiltration nach Leberresektion unter Blockade von c-KIT und SDF-1

Um die Migration der Tumorzellen zu quantifizieren wurde die Migrationsdistanz und die Anzahl der migrierten Tumorzellen erfasst (siehe Abbildung 26). Ein Gruppenvergleich

erzielte keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf die Migrationsweite und die Anzahl der migrierten Zellen. Der Abstand der migrierten Zellen nahm im Verlauf des Untersuchungszeitraumes in allen Gruppen konstant zu. An Tag 5 waren die Zellen in der PHX/ α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe $328,8 \pm 29,5 \mu\text{m}$ migriert, in der PHX/ α -c-KIT Gruppe $296,2 \pm 7,2 \mu\text{m}$ (vs. PHX Gruppe mit $290,5 \pm 16,5 \mu\text{m}$). Die Anzahl der migrierten Zellen veränderte sich nach Tag 5 nicht mehr signifikant. In der PHX/ α -c-KIT Gruppe waren an Tag 5 $21,9 \pm 0,9$ Zellen pro Beobachtungseinheit migriert, in der PHX Gruppe $18,2 \pm 2,2$ Zellen. In der PHX/ α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe waren es zu dem Zeitpunkt $19,9 \pm 1,1$ migrierte Zellen.

Die Analyse der Tumordinfiltration zeigte, dass in der PHX/ α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe die Infiltration mit $19,7 \pm 5,6 \%$ von der Gesamttumorfläche signifikant niedriger war als in der PHX Gruppe mit $73,3 \pm 3,5\%$ und in der PHX/ α -c-KIT Gruppe mit $59,9 \pm 4,1 \%$. Ein Vergleich zwischen der PHX/ α -c-KIT Gruppe und der PHX Gruppe führte nicht zu einem signifikanten Unterschied.

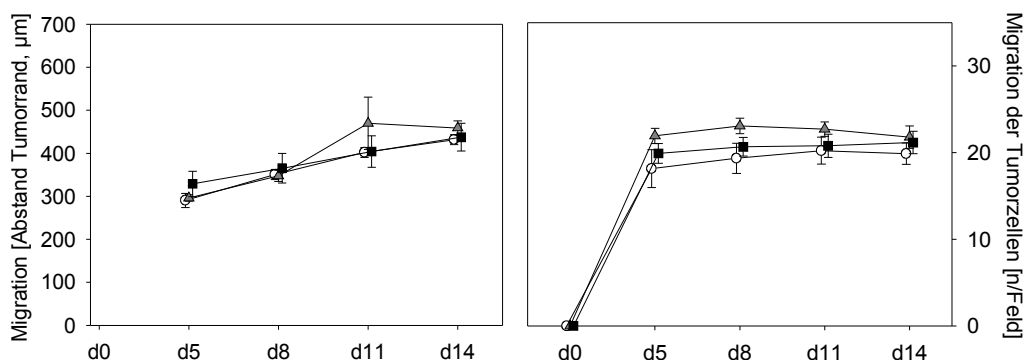


Abbildung 26: Migrationsweite und Anzahl der migrierten Tumorzellen der leberresezierten Tiere

Der Vergleich der Migrationsdistanz (Abbildung A) und der Anzahl der migrierten Zellen (Abbildung B) ergab keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich. Nach Behandlung mit dem anti-c-KIT-Antikörper konnten in der PHX/ α -c-KIT Gruppe etwas mehr migrierte Zellen nachgewiesen werden als in der PHX Gruppe. Die zusätzliche Gabe von anti-SDF-1 führte zu keinem veränderten Effekt auf die Migration. Angaben: Mittelwert \pm SEM; (PHX = weiße Kreise, PHX/ α -c-KIT = graue Dreiecke, PHX/ α -c-KIT/ α -SDF-1 = schwarze Vierecke).

4.9. Tumorzellproliferation und -apoptose nach Leberresektion unter Blockade von c-KIT und SDF-1

Die Proliferation der Tumorzellen wurde durch die alleinige Gabe von anti-c-KIT-Antikörper im Vergleich zur PHX Gruppe nicht signifikant beeinflusst. (PHX/ α -c-KIT Gruppe $76,7 \pm 1,6$ % vs. PHX Gruppe $82,3 \pm 2,3$ %). In der PHX/ α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe lag die Proliferationsrate mit $40,0 \pm 3,3$ % signifikant niedriger als in den beiden anderen Gruppen.

Der prozentuale Anteil der apoptotischen Tumorzellen reduzierte sich nach anti-c-KIT Applikation im Vergleich zur PHX Gruppe nicht signifikant (PHX/ α -c-KIT Gruppe $12,1 \pm 4,5$ % vs. PHX Gruppe $17,4 \pm 3,6$ %). Die zusätzliche Gabe von anti-SDF-1 führte in der PHX/ α -c-KIT/ α -SDF-1 Gruppe mit $6,6 \pm 3,2$ % zu einer signifikanten Verminderung der apoptotischen Zellen gegenüber der PHX Gruppe.

5. Diskussion

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine Knochenmarkdepression durch eine c-KIT-Rezeptor Blockade zu einem signifikant gesteigerten Wachstum kolorektaler Tumore führt. Diese Verstärkung des Tumorwachstums beruhte auf einer signifikanten Verringerung der Apoptoserate (siehe Abbildung 20) und einer signifikanten Steigerung der Tumorzellproliferation (siehe Abbildung 19F) unter Knochenmarkdepression. Dabei wurde die Tumorneovaskularisierung und die Migration von Tumorzellen nicht entscheidend beeinflusst. Interessanterweise verminderte die zusätzliche Gabe von anti-SDF-1 das durch die c-KIT-Blockade gesteigerte Tumorwachstum auf das Niveau der KON Gruppe.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das verstärkte Tumorwachstum, das unter Knochenmarkdepression durch anti-c-KIT induziert wurde, abhängig vom SDF-1/CXCR4 Signalweg ist.

5.1. Das transparente Rückenhautkammer-Modell

Die Versuche wurden mit der transparenten Rückenhautkammer durchgeführt. Es gibt nur sehr wenige Modelle, die die Untersuchung der Angiogenese und Revaskularisierung im dynamischen Verlauf erlauben. Außer dem Modell der transparenten Rückenhautkammer existiert noch das Ohr der haarlosen Maus, mit dem eine intravitalmikroskopische Untersuchung der Gefäße möglich ist [11]. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie war die grundlegende Technik zur Untersuchung der Neovaskularisierung über einen längeren Zeitraum an ein und dem selben Tier, so dass dynamische Verläufe quantifiziert werden konnten. Zur Intravitalmikroskopie mußten beim Rückenhautkammermodell die Tiere jedoch narkotisiert werden, was Einfluss auf die mikrohämodynamischen Parameter, wie Gefäßdurchmesser und Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit nehmen könnte [29; 74; 100]. Eine Narkose ist hingegen bei dem Modell „Ohr der haarlosen Maus“ nicht nötig. Das Modell ermöglicht zusätzlich einen wesentlich einfacheren Zugangsweg ohne chirurgisches Trauma oder Operation.

Zur Untersuchung der Neovaskularisierung von Tumorzellen ist aber nur das Mikrozirkulationsmodell der Rückenhautkammer geeignet. Es ist ein standardisiertes Verfahren, das eine kontinuierliche und regelmäßige Quantifizierung der Neovaskularisierung ermöglicht [97; 92; 96]. Das Modell ist etabliert für die Verwendung

mit Ratten [116], Hamstern [43, 88], Nackt- und SCID-Mäusen (Severe Combined Immunodeficiency) [92], sowie immunkompetenten Mäusen [93]. Die Rückenhautkammer hat sich bereits zur Untersuchung der Angiogenese und der Neovaskularisierung in verschiedenen Geweben bewährt. Es wurden synthetische und biologische Implantationsmaterialien in die Rückenhautkammer implantiert [95; 98], zum Beispiel Langerhans-Zellen [99], Milzgewebe [50], Ovarialfollikeln [144], Endometriumgewebe [89], Tumoren [44], malignen Gliomen [142], Kolonkarzinomen [82; 93; 126]. Bei einem längeren Untersuchungszeitraum (von > 3-4 Wochen) kommt es allerdings zur Erschlaffung und Verzerrung der aufgespannten Rückenhaut in der Kammer [53]. Um dies zu vermeiden, lag in dieser Arbeit die Implantationszeit der Rückenhautkammer bei 16 Tagen.

Es ist ein bekanntes Phänomen, dass das Einwachsen von künstlich induzierten Tumoren von der verwendeten Zelllinie abhängt und in direkter Korrelation zur Anzahl der implantierten Tumorzellen steht [48]. In den Versuchen wurden ausschließlich CT26-GFP Zellen implantiert, die bei Balb/c-Mäusen sehr gute Ergebnisse zeigten. In anderen Studien wurden CT26-GFP Zellen in einem Volumen von 1×10^4 bis 1×10^6 implantiert, ohne zu überprüfen ob mit diesem Volumen ein standardisiertes Tumorstadium erreicht wurde [135; 62; 138; 145;]. In dieser Arbeit konnte mit 1×10^5 Zellen ein isoliertes, standardisiertes Tumorstadium erzielt werden.

Die Lösung, in der die Tumorzellen suspendiert wurden, ist ein weiterer wichtiger Faktor des Tumorstadiums. Einige Autoren anderer Studien geben keine genaueren Informationen, welche Flüssigkeit für die Zellsuspension der implantierten Zellen verwendet wurde [70; 138; 145]. In den meisten Studien wurde jedoch Hank's balanced salt solution (HBSS) [62; 135] oder Phosphate buffered saline solution (PBS) [108] verwendet, nur wenige injizierten suspendierte Zellen in Zellmedien [25]. In einer Studie von KOLLMAR et al., konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen in einer neutralen Suspension, wie PBS gelöst werden sollten. Die Verwendung von Zellkulturmedien maskieren die normalen Charakteristiken des Tumorstadiums, indem bereits sieben Tage nach Tumorstadium exzessive Tumormassen entstehen [84]. Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Studie die Tumorzellen in PBS gelöst.

Die Übertragbarkeit von experimentellen Tumormodellen am Tier auf die Situation im menschlichen Patienten wird kritisch diskutiert. Die CT26.WT Tumorzelllinie ist eine häufig benutzte Zelllinie und ist als Modell für das kolorektale Karzinom etabliert [27; 70; 138;

145], da sie ein zum Menschen vergleichbares Tumorwachstum mit Metastasierung verursacht. Einige Studien berichten über die Mechanismen der Tumor-Stroma Interaktionen [87], der Zell-Extrazellulärmatrix Adhäsion [91], der Fibronectin- $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv und der $\beta 1$ -Integrin Anlagerung [55] an CT-26.WT Tumorzellen. Darüber hinaus existieren Studien, die die Immunantwort einschließlich der Lymphozyteninfiltration und CD8⁺ Aktion analysierten und weitere Ansätze einer anti-tumorösen Immuntherapie an der CT-26.WT Zelllinie erarbeiteten [4; 24; 27; 70; 73; 120; 128; 145]. Da diese Zelllinie so ausgiebig untersucht und analysiert wurde und es ein adäquates Modell ist, das dem kolorektalen Karzinom des Menschen sehr ähnlich ist, wurde in der vorliegenden Studie die CT-26-Zelllinie verwendet.

5.2. Chemokine und die Wirkung von SDF-1 auf Tumorzellen

Chemokine spielen eine wesentliche Rolle beim Homing von hämatopoetischen Zellen an spezifische Organe [9] und neoplastischen Zellen [19]. Viele Chemokine binden an mehrere verschiedene Rezeptoren. Ebenso können an einen Chemokinrezeptor eine Vielzahl unterschiedlicher Chemokine binden [9]. SDF-1, in früherer Nomenklatur auch CXCL12 genannt, ist jedoch der einzige Ligand des Rezeptors CXCR4 [9; 103]. Im Gegensatz dazu bindet SDF-1 neben dem Rezeptor CXCR4 auch noch an den Rezeptor CXCR7 [20]. SDF-1 verursacht eine Aktivierung der Kalziummobilisierung, die über den Rezeptor CXCR4 vermittelt wird. Darüberhinaus führt die Bindung von SDF-1 zu einer Aktivierung mehrerer mitogen-aktivierter Proteinkinase-Signalwege, beispielsweise der extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK-1/2), der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) und der Proteinkinase B (Akt) Signalwege. Diese Kinasen sind an der Zellmigration, der Proliferation, der Differenzierung und dem Zellüberleben beteiligt [137]. Es wird vermutet, dass CXCR4 die Fähigkeit hat, zwischen Tumorzellen und Endothelzellen durch Aktivierung von Zellbewegung, Integrinfunktion und transendothelialer Migration zu interagieren [32; 45]. An Hand einer nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie konnten PHILLIPS et al. in vitro eine direkte Bewegung von Tumorzellen als Reaktion auf einen chemotaktischen Gradienten von CXCL12-CXCR4 zeigen, die bei einer Konzentration von 10 ng/ml SDF-1 die höchste Anzahl von migrierten Zellen erreichte [118]. In Übereinstimmung mit anderen Studien konnten KOLLMAR et al. mit in vitro Assays eine dosisabhängige Zunahme der Tumorzellmigration als Antwort auf SDF-1 zeigen [17; 82; 107; 112]. In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von CXCR4 auf Tumorzellen mit einem verstärkten Tumorwachstum

assoziiert war. Überdies wies der Tumor ein wesentlich aggressiveres Wachstumsmuster auf [32; 112; 113; 150]. Darüber hinaus konnte belegt werden, dass eine Blockade von CXCR4 ein Tumorstadium in vivo supprimiert [59; 149]. CXCR4 spielt also eine wesentliche Rolle beim Prozess des Tumorstadiums und der Metastasierung, wobei die genauen Abläufe bis jetzt unklar sind. ORIMO et al. konnten in ihrer Studie eine Inhibierung des Brustkrebstadiums in vivo durch die gezielte Blockade von SDF-1 zeigen [110]. Im Gegensatz dazu führte die Neutralisation von SDF-1 des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms bei PHILLIPS et al. in vivo nicht zu einer Reduktion der Tumorstadiumgröße [118].

Die genauen Mechanismen, wie SDF-1 das Wachstum und die Etablierung von Tumorzellen und Metastasen beeinflusst ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt, dass SDF-1 sowohl die Zellproliferation als auch die Zellapoptose beeinflusst. TILTON et al. konnten zeigen, dass SDF-1 die nukleäre Translokation des Transkriptionsaktivators ERK-2 und der AKT Kinase stimuliert [137]. Des weiteren konnte nachgewiesen werden, dass SDF-1 mitogen Proteinkinasen, wie AKT aktiviert, ohne die Fas-Ligand induzierte Apoptose zu beeinflussen [17]. Der SDF-1/CXCR4 Signalweg greift so in das Wachstum von invasiven und mikrometastatischen Tumoren ein [149]. Dies geschieht durch die Modulation der anti-apoptotischen AKT Kinase [10] und der Lipid-Kinase PI-3 K [90]. Einige Studien kommen zu der Schlussfolgerung, dass die PI 3-Kinase-abhängige Aktivierung von AKT Kinase die Apoptose von Tumorzellen inhibiert und das Überleben der Zellen fördert [21; 33; 85]. Darüber hinaus führt die Aktivierung von ERK-1/2 und AKT zu einer verstärkten Tumorzellproliferation und zu einer Modulation des anti-apoptotischen Signalweges [12; 33]. KOLLMAR et al. konnten in vivo zeigen, dass SDF-1 die Tumorzellproliferation stimuliert und den Zelltod durch Apoptose inhibiert [82]. Dieser Vorgang scheint die Ursache für die beobachtete chemokinabhängige Stimulation des Tumorstadiums zu sein.

Neoangiogenese in Tumoren entsteht durch das Ungleichgewicht zwischen der Überexpression pro-angiogener Faktoren und der Inhibierung anti-angiogener Faktoren. Chemokine bestehen aus vier konservierenden Cysteinmotiven in der Aminosäuresequenz, die essentielle Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen bilden [28]. Die Gruppe der CXC Chemokine können je nach An- bzw. Abwesenheit des Tripeptidmotives Glutamat-Leucin-Arginin (ELR) N-terminal des ersten Cystein in ELR⁻ - oder ELR⁺ - Chemokine eingeteilt werden [134]. ELR⁺ - Chemokine einschließlich CXCL

1-3 und CXCL 5-8 (z.B. MIP-2 und IL-8) sind potente Aktivatoren der Neoangiogenese [134]. CXC Chemokine mit einem ELR⁻ - Motiv, wie z.B. CXCL4 sind hingegen wirkungsvolle Inhibitoren der Angiogenese. SDF-1 gehört zwar nicht zur Gruppe der ERL⁺ - CXC Chemokine, ist aber trotzdem in die Modulation der Angiogenese durch Bindung an seinen Rezeptor CXCR4 involviert [8; 129]. Der SDF-1/CXCR4 Signalweg ist ein essentieller Bestandteil beim Prozess der Neoangiogenese, da Versuchstiere mit defektem CXCR4 oder fehlerhaftem SDF-1 auf Grund großer Defekte im vaskulären System bereits perinatal versterben [136].

DARASH-YAHANA et al. demonstrierten an Hand des Prostata Karzinoms, dass eine Überexpression von CXCR4 im Tumor zu einer vergrößerten Anzahl an Blutzellen im Tumor führt [32]. Dies wurde auf eine verstärkte Sekretion von VEGF auf Grund der Überexpression von CXCR4 zurückgeführt. Diese Ergebnisse werden durch die Tatsache bestätigt werden, dass eine Neutralisation von CXCR4 die Neubildung von Gefäßen erfolgreich inhibiert [32; 59]. Es existieren weitere in vitro Studien, die eine CXCR4 provozierte Tumorzellmigration in Richtung SDF-1 belegen, welche von einer autokrinen VEGF-Expression abhängig ist [8]. Interessanterweise scheint SDF-1 selbst die VEGF Expression zu beeinflussen [17]. BRAND et al. zeigten unter Verwendung der Zelllinie HT-29 des kolorektalen Karzinoms eine achtfache Hochregulation der mRNA Expression von VEGF durch SDF-1. Zusätzlich nimmt der VEGF Proteinlevel um das 5,8-fache zu. Diese Ergebnisse wurden von YANG et al. in einer Studie mit einer Glioblastomzelllinie bestätigt [147]. In vitro konnte die Korrelation der Expression von CXCR4 mit einem malignen Phänotyp des Tumors und der Stimulation der VEGF-Produktion nachgewiesen werden [86]. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde ein synergistischer Effekt von VEGF und SDF-1 auf die Tumorangiogenese vermutet. Durch die Hochregulation von CXCR4 auf Endothelzellen wirkt VEGF synergistisch auf die SDF-1 vermittelte Migration und Expansion der Endothelzellen. In vitro demonstrierten Carr et al. eine verstärkte Sprossung von Gefäßen durch exogenes SDF-1, selbst wenn keine zirkulierenden, endothelialen Progenitorzellen im System vorhanden waren [23]. Parallel zu diesen Ergebnissen beobachteten ORIMO et al., dass Karzinom-assoziierte Fibroblasten, die eine große Menge von SDF-1 in ihrem Sekret ausscheiden, die Angiogenese durch Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen fördern [110]. Eine weitere Studie von KOLLMAR et al. zeigte eine Beschleunigung, nicht aber eine Verstärkung der Neoangiogenese durch SDF-1-Applikation [82]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen

steht eine Arbeit von PHILLIPS et al., welche keine Beeinflussung des Prozesses der Tumervaskularisierung durch eine SDF-1 Blockade aufzeigt [118]. In der vorliegenden Arbeit wurde durch eine Blockade von SDF-1 und einer zusätzlichen Gabe des c-KIT-Antikörpers die Bildung von Blutgefäßen signifikant im Vergleich zur KON Gruppe verlangsamt. Bezogen auf die Wirkung von SDF-1 lassen sich die Ergebnisse dieser Studie mit den Versuchen von KOLLMAR et al. [82] in Einklang bringen.

5.3. Einfluss von EPCs und HCs auf die Angiogenese

Die vom Knochenmark abstammenden hämatopoetischen Stammzellen bilden physiologische und pathologische Blutgefäß-Formationen. Während des Tumorwachstums führt die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen zu einer Rekrutierung von EPCs und HCs, die ihrerseits in der Frühphase der Gefäßbildung unter anderem durch Stabilisierung von Gefäßen beteiligt sind. Dies wird als Vaskulogenese bezeichnet [6; 34; 94]. Obwohl bekannt ist, dass endotheliale Zellen den c-KIT-Rezeptor, eine Rezeptor Tyrosinkinase für den Stammzellfaktor, exprimieren, ist die Rolle des SCF/c-KIT Signalweges bezüglich der Angiogenese im Tumor und der Interaktion mit SDF-1 bis jetzt ungeklärt [77; 7]. Reife Endothelzellen produzieren auf gewisse Reize, z.B. Hypoxie zahlreiche Chemokine, Zytokine, Matrix-Metalloproteasen und c-KIT und beschleunigen dadurch die Angiogenese [31; 121]. Viele Studien weisen darauf hin, dass die vom Knochenmark abstammenden EPCs an der Gefäßneubildung im Tumor beteiligt sind [94; 105]. Zusätzlich zu diesem proangiogenen Effekt, haben HCs die Fähigkeit, Tumorwachstum zu inhibieren (TU-assoziierte Makrophagen inaktivieren neoplastische Zellen direkt [31]), zum Beispiel durch Produktion von Inhibitoren der Angiogenese wie Thrombospondin-1 [39]. Da die HCs bezüglich des Tumorwachstums zwei verschiedene Funktionen übernehmen, war es unklar, ob eine Suppression der Migration der hämatopoetischen Zellen und der epithelialen Zellen das Tumorwachstum inhibieren. Es konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Rekrutierung von Knochenmarkszellen die Tumorangiogenese in $Id1^{+/-}Id3^{-/-}$ mutierten Mäusen blockiert. In einer Studie von OKAMATO et al., konnte gezeigt werden, dass eine Knochenmarkdepression durch Blockade des c-KIT-Rezeptors eine Leukozytopenie verursacht und damit die Angiogenese in Colon26 Tumoren inhibiert [108]. Zusätzlich indizieren die HCs die Vaskulogenese, indem sie auf einem parakrinen Signalweg die Freisetzung angiogener Faktoren verstärken und dadurch die Rekrutierung und die Einwanderung der EPCs in das neue Gefäß fördern [58].

Eine Studie von LYDEN et al. zeigt, dass in der frühen Phase des Tumorwachstums, abhängig vom Tumortyp, 50-90% der neuen Gefäße in dem Tumorgewebe aus dem Knochenmark abstammen [94]. Aktuelle Studien allerdings stellen diese These der Vaskulogenese auf dem Boden knochenmarksabstammender Zellen in Frage und postulieren, dass die Sprossung der Gefäße einen wesentlicheren Faktor an der Blutgefäßentstehung im Tumor hat [36; 57]. In einem Modell der syngenischen Knochenmarkstransplantation zeigte SHINDE PATIL et al., dass GFP-exprimierende c-KIT + Progenitorzellen, die vom Knochenmark abstammen von subkutan implantierten Lewis Lungenkarzinomen rekrutiert werden, aber nicht direkt an der Mikrogefäßstruktur teilhaben. Daraus wurde gefolgert, dass selbst wenn die zirkulierenden HCs und EPCs zur Tumorkolonisation wandern, sie selbst an der Tumor-Gefäßbildung nicht beteiligt sind [132]. In einem Modell mit subkutan implantierten Prostatakarzinomzellen konnte Okamoto et al. beobachten, dass es zu einer Akkumulation von HCs um die neuen Gefäße kommt, allerdings konnten diese HCs nicht in den Tumorgefäßen selbst nachgewiesen werden. Deshalb wurde postuliert, dass die HCs nur eine stabilisierende und unterstützende Rolle bei der Entstehung von Blutgefäßen haben [108].

5.4. Einfluss der Knochenmarksdepression auf die Angiogenese

Frühere experimentelle Studien an Mäusen zeigten, dass eine Depletion myeloider und erythroider Zelllinien, einschließlich der HCs und EPCs aus dem Knochenmark durch eine tägliche Injektion von 1mg ACK2 herbeigeführt werden kann [106; 123]. ACK2 ist ein Antagonist des anti-c-KIT Antikörpers, der die c-KIT Funktion blockiert ohne zytotoxische Nebeneffekte auf c-KIT+ Zellen auszulösen [106; 123]. Interessanterweise wuchsen B-Zellen in dem von myeloiden und erythroiden Progenitorzellen befreiten Knochenmark der mit ACK2 behandelten Tiere weiter, ohne dass polymorphkernige Zellen oder Erythroblasten nachgewiesen werden konnten [106; 123]. Die Reduktionsrate der kolonieformenden Zellen im Knochenmark ist von der Anzahl der anti-c-KIT Antikörper abhängig [106]. In der vorliegenden Arbeit wurde der anti-c-KIT Antikörper in einer Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht verwendet, um eine Knochenmarksdepression über eine Zeitspanne von vier Tagen zu induzieren. Dieser Zeitraum wurde gewählt, um chirurgische Komplikationen oder ein frühzeitiges Versterben der Versuchstiere auf Grund einer Immun-Inkompetenz durch Knochenmarksdepletion zu verhindern.

In der Arbeit von OKAMOTO et al. verursacht eine Knochenmarksdepression durch Vorbehandlung mit ACK2 über einen Zeitraum von vier Tagen vor der subkutanen

Implantation der Kolon-Tumorzellen eine Leukopenie, die zehn Tage nach der letzten ACK2 Injektion immer noch nachweisbar war [108]. Darüber hinaus war unter dieser Behandlung das Tumorwachstum und die Aussprossung von Tumorgefäßen bei OKAMOTO et al. in den ersten 5-7 Tagen leicht reduziert. Allerdings kam es zu einem schnellen Wiedereinsetzen des Tumorwachstum sobald die Zahl der zirkulierenden HCs im peripheren Blut später wieder anstieg [108]. Die Autoren kamen deshalb zu der Schlussfolgerung, dass die HCs in das Tumorgewebe migrieren und dort die Initiierung der Tumorneovaskularisierung verursachen.

In der vorliegenden Studie wurde allerdings nicht ACK2 sondern ACK45 als anti-c-KIT Antikörper verwendet. Den Tieren wurde 1 mg/kg Körpergewicht ACK45 für vier Tage peritoneal injiziert. OKAMOTO et al. verwendete in seiner Arbeit eine wesentlich höhere Dosierung von 1 mg ACK2 täglich für vier Tage intravenös [108]. Der monoklonale Antikörper ACK45 soll nach NISHIKAWA et al. in der Wirkung analog zu ACK2 sein [104]. SCHMIDT-OTT et al. zeigte in einem in vitro Versuch von embryonalem Nierengewebe dass die Applikation von ACK45 in einer Dosierung von 50 µg/ml zu einem verminderten Wachstum von Glomeruli führt, und damit den c-KIT Rezeptor blockiert [131]. In einer Arbeit von LI et al. wurde ACK45 als monoklonaler Antikörper in einem in vitro Versuch an Pankreasgewebe verwendet [94]. Dabei zeigte sich im Westernblot ein Anstieg der c-KIT Phosphorylierung nach Blockade mit ACK45. Es verminderte sich die Anzahl der apoptotischen Zellen und es kam zu einer vermehrten Differenzierung der Inselzellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ACK45 ähnliche regeneratorsche Effekte auf die β -Zelldifferenzierung und das Überleben der Zellen im Pankreas hervorruft wie der c-KIT Ligand selbst und dieser Antikörper unter Umständen nicht die Wirkung von c-KIT im Pankreasgewebe antagonisiert. In der hier vorliegenden Arbeit kam es unter Blockade mit ACK45 zu einer Verstärkung des Tumorwachstums und der Tumorzellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Tumovaskularisierung, die Gefäßdichte und die Tumordinfiltration waren nahezu unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Darüberhinaus kam es zu einer Verminderung der Apoptoserate. Der Anstieg der VEGF Expression nach ACK45 Applikation sowie die Hochregulation von CXCR4 im Westernblot sprechen ebenfalls für eine Aktivierung des c-KIT Rezeptors durch diesen monoklonalen Antikörper. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtung von LI et al., und deuten darauf hin, dass der monoklonale Antikörper ACK45 nicht die Funktion des c-KIT Rezeptors blockiert.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass der Stammzellfaktor-Rezeptor c-KIT essentiell für die Entstehung von Blutzellen, Melanozyten, „Germ“-Zellen, Mastzellen und intestinale Zellen von Cajal Typ ist [68]. Darüber hinaus weist ein Großteil der Tumorzellen, vor allem die Tumoren der Neuralleiste, der Mamma, der Lunge, der Prostata und des kolorektalen Karzinoms, eine aberrante c-KIT Expression auf [140]. Hauptsächlich gastrointestinale Stromatumore (GIST) exprimieren den c-KIT-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Darüber hinaus weisen sie eine Mutation des KIT auf, welche eine überschießenden Aktivierung des KIT-Signalweges bedingt, die zu einer unkontrollierten Tumorzellproliferation und einer Abschwächung der Tumorzellapoptose führt [37; 66]. Imatinib, ein selektiver Inhibitor von Protein-Tyrosinkinasen, einschließlich KIT, stellt derzeit ein Medikament zur Behandlung von Patienten mit GIST-Tumoren, abhängig vom Mitose-Index des GIST Tumors dar. Imatinib induziert einen Stillstand der Tumorzellproliferation und verursacht apoptotischen Zelltod. In etablierten MCA26 Tumoren konnten PAN et al. zeigen, dass eine Injektion von ACK2 die Tumor induzierte Immuntoleranz deutlich reduziert [114]. Darüber hinaus konnten sie nachweisen, dass eine anti-c-KIT Therapie mit ACK2 eine tumorspezifische T-Zell Unempfindlichkeit hervorruft und die Entwicklung T-regulierenden Zellen (Treg) verhindern kann. In Kombination mit einer immunmodulierenden Therapie mit Interleukin-12 (IL-12) und 4-1BB (transmembranes Glykoprotein, das der TNF Familie angehört) Aktivierung, verbesserte die Behandlung mit anti-c-KIT Antikörper signifikant die Langzeit-Überlebensrate der MCA26 Tumor tragenden Mäuse [114]. In der vorliegenden Studie waren ungefähr 8% der benutzten CT-26.WT-Zellen c-KIT Rezeptor positiv. Deshalb ist ein direkter inhibitorischer Effekt der Tumorzellproliferation auf Grund der anti-c-KIT Behandlung nicht zu erwarten.

5.5. Einfluss von anti-c-KIT und anti-SDF-1 auf das Tumorwachstum

Die Rekrutierung von HCs und EPC wird hauptsächlich durch SDF-1 und seinen Rezeptor CXCR4 vermittelt [38; 63], da HCs und EPCs entlang eines „chemotaktischen“ Gradienten zu den höheren Konzentrationen von SDF-1 migrieren [19; 76; 115]. KAMINSKI et al. zeigten, dass nahezu 100% der c-KIT+ Zellen aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut positiv für CXCR4 sind [76]. In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass eine Neutralisierung von SDF-1 nach einer Vorbehandlung mit anti-c-KIT Antikörper zu einer signifikanten Reduktion der Neovaskularisierung führt, wahrscheinlich verursacht durch eine Inhibierung der HC und EPC Rekrutierung in den Tumoren. Zusätzlich führt die Kombination einer Vorbehandlung mit anti-c-KIT und einer

anti-SDF-1 Applikation zu einer verstärkten Tumorzellproliferation und einer Steigerung der Invasion von Tumorzellen. Diese Effekte bewirken zusammen nach einer Neutralisation von SDF-1 eine Aufhebung der stimulierenden Effekte auf das Tumorzell-Engraftment, die durch die Knochenmarksuppression verursacht wurde. Ferner führt die Behandlung mit anti-c-KIT und anti-SDF-1 zu einer Inhibierung der lokalen und der B-Lymphopoese- assoziierten Angiogenese.

Wie von KAMINSKI et al. beschrieben ist die Anwesenheit von aktivem chemotaktischem SDF-1 und endothelialen Entzündungsaktivatoren wie TNF- α notwendig, damit c-KIT+ Zellen funktionelle, relevante Interaktionen mit Endothel und postkapillären Venolen bilden können [76]. Eine Blockade von ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) und CXCR-4 löst die Adhäsion von c-KIT+ Zellen, die an vaskuläres Endothel gebunden sind trotz einer Applikation von SDF-1 und TNF- α auf. Darüber hinaus, konnte an Hand eines Cremaster-Muskel- Mikorzirkulationsmodell, eine signifikante Reduktion der Stammzelladhäsion nachgewiesen werden, solange eNOS nicht anwesend war bzw. systemisches NOS inhibiert wurde [76]. Eine Verstärkung der CXCR-4 Expression führt zu einer Stimulation von SDF-1 und TNF- α [76]. Diese Faktoren aktivieren das Endothel und führen zu einer relevanten Stammzellen Einwanderung [76]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass die Verstärkung von CXCR-4- und VEGF-Expression innerhalb des Tumors einen kompensatorisch aktivierten Signalweg nach anti-c-KIT Behandlung darstellt. Die Neutralisierung von SDF-1 inhibiert Interaktionen von c-KIT+ Zellen innerhalb der Tumorgefäße, und als Konsequenz daraus, führt dies zu einer Inhibierung der Tumorneovaskularisierung.

5.6. Auswirkungen der Leberresektion auf das Tumorwachstum

In der vorliegenden Arbeit wurde die Tumorzellimplantation simultan zur Leberresektion durchgeführt. Dieses Verfahren ist in der Literatur vielfach etabliert [35; 41; 119; 122; 130; 139]. Es stellt ein vom Ablauf her genaues Korrelat zur Situation in-vivo dar, bei der die Sprossung der Tumorzellen in das extrahepatische Gewebe während der Leberresektion stattfindet. Bereits etablierte extrahepatische Metastasen können vor Leberresektion durch CT, MRT oder PET diagnostiziert und reseziert werden. Deshalb ist es von geringer klinischer Relevanz den Einfluss einer Leberresektion auf bereits etablierte Metastasen zu untersuchen, so dass in dieser Arbeit das Wachstum noch nicht etablierter Metastasen zum Zeitpunkt der Leberresektion unter Blockade des c-KIT-Rezeptors und anti-SDF-1 Applikation untersucht wurde.

Die leberresezierten Tiere zeigen ein vergleichbares Ergebnis wie die nicht leberresezierten Tiere. In einer Studie von KOLLMAR et al., konnte gezeigt werden, dass es nach Leberresektion neben der parenchymatösen Regeneration auch zu einer Stimulation des Tumorwachstums in der verbleibenden Leber kommt [81; 41]. Darüber hinaus existieren Studien, die einen Zusammenhang zwischen chirurgischem Stress und Zunahme des Wachstums von Tumormetastasen vermuten [139]. Andere behaupten, dass eine Leberresektion das Wachstum extrahepatischer Metastasen beschleunigt [130; 139].

Im Gegensatz dazu berichten andere Studien von einer Regression extrahepatisch implantierter Tumorzellen nach partieller Leberresektion [109; 119]. DE JONG et al. zeigten in einem Modell mit Kolonkarzinomzellen, dass eine große Leberresektion in der Ratte das metastatische Wachstum in der verbleibenden Leber verstärkt, nicht aber an Läsionen im subkapsulären oder retroperitonealen Raum [35]. Der Einfluss der Leberresektion auf das Tumorwachstum scheint abhängig von der Lokalisation der Metastase zu sein. In einer tierexperimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass die Stärke der Tumorwachstumsstimulation abhängig vom Volumen des resezierten Lebergewebes ist [127]. Eine 30%-ige Leberresektion führte lediglich zu einem leichten jedoch nicht signifikanten stimulierenden Effekt auf das extrahepatische Tumorwachstum. Eine 70%-ige Resektion der Leber führte hingegen zu einem exzessiv beschleunigten Wachstum subkutan implantierter Metastasen des Kolonkarzinoms. Die Ursache für diesen unterschiedlichen Effekt von großer und kleiner Leberresektion ist nach wie vor unklar. RUPERTUS et al. konnten zeigen, dass durch eine 70% Hepatektomie die Neovaskularisierung signifikant verstärkt wird, was mit einer signifikant erhöhten Gefäßdichte einher ging. Eine andere Studie von DRIXLER et al. zeigte, dass ein durch Leberresektion induziertes Tumorwachstum in der verbleibenden Leber durch anti-angiogene Therapie verhindert werden kann [41]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine große Leberresektion in einigen Gruppen gewählt, um eine möglichst starke Stimulation des extrahepatischen Tumorwachstums zu erreichen. Mit Antikörpern wurde nun versucht diese Wachstumssteigerung signifikant herunter zu regulieren. Ein direkter Vergleich der leberresezierten Tiere mit den nicht leberresezierten Tieren war im Laufe dieses Versuches nicht möglich. Dies wäre nur durch eine Laparatomie an nicht leberresezierten Tieren möglich gewesen, um den Einfluss des chirurgischen Stresses auf das Tumorwachstum als Einflussgröße auszuschalten.

Das Verhalten der extrahepatischen Metastasen nach Leberresektion war in allen bestimmten Parametern vergleichbar mit den nicht leberresezierten Tieren. Die alleinige Gabe des c-KIT-Antikörpers in Kombination mit Leberresektion führte zu einem gesteigerten Tumorwachstum. Wurde allerdings zur Knochenmarkdepression zusätzlich SDF-1 blockiert, ging das Tumorwachstum wieder auf das Niveau der KON Gruppe zurück. Auch nach Leberresektion senkte die Applikation von anti-c-KIT und anti-SDF-1 Antikörper die Angiogenese und die Gefäßdichte des Tumors. Ebenfalls kam es zu einer verminderten Infiltrationstiefe der Tumorzellen in die Muskulatur nach anti-c-KIT und anti-SDF-1 Applikation. Auch die Proliferations- und Apoptoserate sank nach Behandlung mit beiden Antikörpern unter das Niveau der Kontroll- und α -c-KIT Gruppe mit Leberresektion. Daraus lässt sich schließen, dass die Leberresektion und die dadurch ausgeschütteten Wachstumsfaktoren den Einfluss auf das Wachstum des Tumors nach anti-c-KIT und anti-SDF-1 Gabe nicht verändern.

5.7. Schlussfolgerung

Eine Knochenmarksuppression durch anti-c-KIT Vorbehandlung kann das Tumorzell-Engraftment in kolorektalen Tumoren signifikant verstärken. Durch anti-SDF-1 Behandlung neutralisiert sich dieses verstärkte Tumorwachstum wiederum vor allem durch Inhibierung der Neovaskularisierung. Der Einfluss von anti-c-KIT und anti-SDF-1 in Kombination sollte weiter untersucht werden, um deren genaue Wirkung auf das Wachstum kolorektaler Metastasen besser zu verstehen und dies therapeutisch nutzen zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. ABDALLA EK, VAUTHEY JN, ELLIS LM, ELLIS V, POLLOCK R, BROGLIO KR, HESS K, CURLEY SA (2004). Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 239:818-825.
2. ABDOLLAHI A, HLATKY L, HUBER PE (2005). Endostatin: the logic of antiangiogenic therapy. *Drug Resist Updat* 1:59-74.
3. ADAM R, AVISAR E, ARICHE S, GIACHETTI D, AZOULAY D, CASTAING D, KUNSTLINGER F, LEVI F, BISMUTH F (2001). Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal (liver) metastases. *Ann Surg Oncol* 84:347-353.
4. ALI S, AHMAD M, LYNAM J REES RC, BROWN N (2004). Trafficking of tumor peptide-specific cytotoxic T lymphocytes into the tumor microcirculation. *Int J Cancer* 110:239-244.
5. ANDERSON DM, LYMAN SD, BAIRD A, WIGNALLI JM, EISENMAN J, RAUCH C, MARCH CJ, BOSWELL HS, GIMPEL SD, COSMAN D, WILLIAMS DE (1990). Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 63:235-243.
6. ASAHRA T, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA C, PASTORE C, SILVER M, KEARNE M, MAGNER M, ISNER JM (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularisation. *Circ Res* 85:221-228.
7. AYE M, HASHEMI S, LECLAIR B, ZEIBDAWI A, TRUDEL E, HALPENNY M, FULLER V, CHENG G (1992). Expression of stem cell factor and c-kit mRNA in cultured endothelial cells, monocytes and cloned human bone marrow stromal cells (CFU-RF). *Exp Hematol* 20:523-527.
8. BACHELDER RE, WENDT MA, MERCURIO AM (2002). Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Canc Res* 62:7203-7206.
9. BAGGIOLINI M (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568.
10. BARBERO S, BONAVIDA R, BAJETTO A, PORCILE C, PIRANI P, RAVETTI JL, ZONA GL, SPAZIANTE R, FLORIO T, SCHETTINI G (2003). Stromal cell-derived factor-1 alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res* 63:1969-1974.
11. BARKER JH, HAMMERSEN F, BONDÀR I, UHL E, GALLA TJ, MENDER MD, MESSMER K (1989). The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation. *Plast Reconstr Surg* 83:948-959.

12. BERBERO S, BONAVIA R, BAJETTO A, PORCILE C, PIRANI P, RAVETTI JL, ZONA GL, SPAZIANTE R, FLORIO T, SCHETTINI G (2003). Stromal cell-derived factor-1 alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res* 63:1969-1974.
13. BERTOLINI F, PAUL S, MANCUSO P, MONESTIROLI S, GOBBI A, SHAKED Y, KERBEL RS (2003). Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer Res* 63:4342-4346.
14. BISMUTH H, ADAM R, LEVI F, FARABOS C, WAECHTER F, CASTAING D, MAJNO P, ENGERRAN L (1996). Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg* 224:509-522.
15. BLECHMAN JM, LEV S, BRIZZI MF, LEITNER O, PEGORARO L, GIVOL D, YARDEN Y (1993). Soluble c-kit proteins and antireceptor monoclonal antibodies confine the binding site of the stem cell factor. *J Biol Chem* 268:4399-4406.
16. BLEUL CC, FUHLBRIGGE RC, CASASNOVAS JM, AIUTI A, SPRINGER TA (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184:1101-1109.
17. BRAND S, DAMBACHER J, BEIGEL F, OLSZAK T, DIEBOLD J, OTTE JM, GÖKE B, EICHHORST ST (2005). CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res* 310:117-130.
18. BRAY F, SANKILA R, FERLAY J, PARKIN DM (2002). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 38:99-166.
19. BURGER JA, KIPPS TJ (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107:1761-1767.
20. BURNS JM, SUMMERS BC, WANG Y, MELIKAN A, BERAHOVICH R, MIAO Z, PENFOLD ME, SUNSHINE MJ, LITTMAN DR, KUO CJ, WEI K, MC MASTER BE, WRIGHT K, HOWARD MC, SCHALL TJ (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203:2201-2213.
21. CARDONE MH, ROY N, STENNICKE HR, SALVESEN GS, FRANKE TF, STANBRIDGE E, FRISCH S, REED JC (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321.
22. CARMELIET P, JAIN RK (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257.
23. CARR AN, HOWARD BW, YANG HT, EBY-WILKENS E, LOOS P, VARBANOV A, QU A, DEMUTH JP, DAVIS MG, PROIA A, TERJUNG RL, PETERS KG (2006). Efficacy of systemic administration of SDF-1 in a model of vascular insufficiency: support for an endothelium-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 69:925-935.

24. CARUSO M, PHAM-NGUYEN K, KWONG YL, XU B, KOSAI KI, FINEGOLD M, WOO SL, CHEN SH (1996). Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for metastatic colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 93:11302-11306.
25. CHAN WS, PAGE CM, MCLELLAN JR, TURNER GA (1988). The growth and metastasis of four commonly used tumour lines implanted into eight different sites: evidence for site and tumour effects. *Clin Exp Metastasis* 6:233-44.
26. CHAVAKIS E, AICHER A, HEESCHEN C SASAKI K, KAISER R, EL MAKHFI N, URBICH C, PETERS T, SCHARFFETTER-KOCHANKE K, ZEIHNER AM, CHAVAKIS T, DIMMELE S (2005). Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med* 201:63-72.
27. CHEN SH, PHAM-NGUYEN KB, MARTINET O, HUANG Y, YANG W, THUNG SN, CHEN L, MITTLER R, WOO SL (2000). Rejection of disseminated metastases of colon carcinoma by synergism of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. *Mol Ther* 2:39-46.
28. CHRISTOPHERSON KC 2nd, HORMAS R (2001). Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. *Stem cell* 19:388-396.
29. COLANTUONI A, BERTUGLIA A, INTAGLIETTA M, GROSS JF (1982). Microangiodynamics in the artefact free microcirculation. *Int J Microcirc* 3:265-266.
30. COPELAND NG, GILBERT DJ, CHO BC, DONOVAN PJ, JENKINS NA, COSMAN D, ANDERSON D, LYMAN SD, WILLIAMS DE (1990). Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell* 63:175-183.
31. COUSSENS LM, WERB Z (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867.
32. DARASH-YAHANA M, PIKARSKY E, ABRAMOVITCH R, ZEIRA E, PAL B, KARPLUS R, BEIDER K, AVNIEL S, KASEM S, GALUN E, PELED A (2004). Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularisation, and metastasis. *Faseb J* 18:1240-1242.
33. DATTA SR, DUDEK H, TAO X, MASTERS S, FU H, GOTOH Y, GREENBERG ME (1997). Akt phosphorylation of bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.
34. DAVIDOFF AM, HATTORI K, DIAS S, COSTA C, BLAIKIE P, BUTROS L, CHADBURN A, HEISSIG B, MARKS W, WITTE L, WU Y, HICKLIN D, ZHU Z, HACKETT NR, CRYSTAL RG, MOORE MA, HAJJAR KA, MANOVA K, BENEZRA R, RAFI S (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7:1194-1201.

35. DE JONG KP; LONT HE, BIJMA AM, BROUWERS MA, DE VRIES EG, VAN VEEN ML, MARQUET RL, SLOOFF MJ, TERPSTRA OT (1995). The effect of partial hepatectomy on tumor growth in rats: in vivo and in vitro studies. *Hepatology* 22:1263-1272.
36. DE PALMA M, VENNERI MA, ROCA C, NALDINI L (2003). Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med* 9:789-95.
37. DEMETRI GD, VON MEHREN M, BLANKE CD, VAN DEN ABBEELE AD, EISENBERG B, ROBERTS PJ, HEINRICH MC; TUVESON DA, SINGER S, JANICEK M, FLETCHER JA, SILVERMAN SG, SILBERMAN SL, CAPDEVILLE R, KIESE B, PENG B, DIMITRIJEVIC S, DRUKER BJ, CORLESS C, FLETCHER CD, JOENSUU H (2002). Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 347:472-480.
38. DESHANE J, CHEN S, CABALLERO S, GROCHOT-PRZECZEK A, WAS H, LI CALZI S, LACH R, HOCK TD, CHEN B, HILL-KAPTURCZAK N, SIEGAL GP, DULAK J, JOZKOWICZ A, GRANT MB, AGARWAL A (2007). Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *J Exp Med* 204:605-618.
39. DIPIETRO LA, POLVERINI PJ (1993). Angiogenetic macrophages produce the angiogenetic inhibitor thrombospondin 1. *Am J Pathol* 143:678-684.
40. DISTLER JW, HIRTH A, KUROWSKA-STOLARSKA M, GAY RE, GAY S, DISTLER O (2003). Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 47:149-161.
41. DRIXLER TA, BOREL RINKES IH, RITCHIE ED, VAN VROONHOVEN TJ, GEBBINK MF, VOEST EE (2000). Continuous administration of angiostatin inhibits accelerated growth of colorectal liver metastases after partial hepatectomy. *Cancer Res* 60:1761-1765.
42. ELIAS D, LIBERALE G, VENEREY D, POCARD M, DUCREUX M, BOIGE V, MALKA D, PIGNON JP, LASSER P (2005). Hepatic and extrahepatic colorectal metastases: when resectable, their localization does not matter, but their total number has a prognostic effect. *Ann Surg Oncol* 12:900-909.
43. ENDRICH B, ASAISHI K, GÖTZ A, MESSMER K (1980). Technical report- a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamster. *Res Exp Med* 177:125-134.
44. ENDRICH B, GOETZ A, MESSMER K (1982). Distribution of microflow and oxygen tension in hamster melanoma. *Int J Microcirc Clin Exp* 1:81-99.
45. ENGL T, RELJA B, MARIAN D, BLUMENBERG C, MÜLLER I, BEECKEN WD, JONES J, RINGEL EM, BEREITER-HAHN J, JONAS D, BLAHETA RA (2006). CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion through alpha5 and beta3 integrins. *Neoplasia* 8:290-301.

46. FEDERSPIEL B, MELHADO IG, DUNCAN AM, DELANEY A, SCHAPPERT K, CLARK-LEWIS I, JIRIK FR (1993). Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics* 16:707-712.
47. FEIL C, AUGUSTIN HG (1998). Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 247:38-45.
48. FISHER ER, FISHER B (1959). Experimental studies of factors influencing hepatic metastasis. I. The effect of number of tumor cells injected and time of growth. *Cancer* 12:926-928.
49. FLANAGAN JG, CHAN DC, LEDER P (1991). Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell* 64:1025-1035.
50. FOITZIK T, FUNK W, ROTH H, MESSMER K (1988). Splenic implants: influence of particle size and fibrin fixation on vascularisation and angiarchitecture. *Pediatr Surg Int* 13:263-268.
51. FONG Y, FORTNER J, SUN RL, BRENNAN MF, BLUMGART LH (1999). Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 230:309-318.
52. FONG Y, KEMENY N, PATY P, BLUMGART LH, COHEN AM (1996). Treatment of colorectal cancer hepatic metastasis. *Semin Surg Oncol* 12:219-252.
53. FUNK W, ENDRICH B, MESSMER K (1986). A novel method of follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res Exp Med* 186:259-270.
54. GALANDIUK S, WIEAND HS, MOERTEL CG, CHA SS, FRITZGIBBONS RJ, PEMBERTON JH, WOLFF BG (1992). Patterns of recurrence after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Surg Gynecol Obstet* 174:27-32.
55. GENG L, ALI SA, MARSHALL JF, MACKAY CL, HART IR, DELCOMMENCE M, STREULI CH, REES RC (1998). Fibronectin is chemotactic for CT 26 colon carcinoma cells: sub-lines selected for increased chemotaxis to fibronectin display decreased tumorigenicity and lung colonization. *Clin Exp Metast* 16:683-691.
56. GILL M, DIAS S, HATTORI K, RIVERA ML, HICKLIN D, WITTE L, GIRARDI L, YURT R, HIMEL H, RAFII S (2001). Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 88:167-174.
57. GÖTHERT JR, GUSTIN SE, VAN EEKELEN JA, SCHMIDT U, HALL MA, JANE SM, GREEN AR, GÖTTGENS B, IZON DJ, BEGLEY CG (2004). Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood* 104:1769-1777.

58. GRUNEWALD M, AVRAHAM I, DOR Y, BACHAR-LUSTIG E, ITIN A, JUNG S, CHIMENTI S, LANDSMAN L, ABRAMOVITCH R, KESHET E (2006). VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124:175-189.
59. GULENG B, TATEISHI K, OHTA M, KANAI F, JAZAG A, IJICHI H, TANAKA Y, WASHIDA M, MORIKANE K, FUKUSHIMA Y, YAMORI T, TSURUO T, KAWABE T, MIYAGISHI M, TAIRA K, SATA M, OMATA M (2005). Blockade of the stomal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. *Cancer Res* 65:5864-5871.
60. GUPTA SK, LYSKO PG, PILLARISETTI K, OHLSTEIN E, STADEL JM (1998). Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 273:4282-4287.
61. HANAHAN D, FOLKMAN J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-364.
62. HANES J, SILLS A, ZHAO Z, SUH KW, TYLER B, DI MECO F, BRAT DJ, CHOTI MA, LEONG KW, PARDOLL DM, BREM H (2001). Controlled local delivery of interleukin-2 by biodegradable polymers protect animal from experimental brain tumors and liver tumors. *Pharm Res* 18:899-906.
63. HATTORI K, DIAS S, HEISSIG B, HACKETT NR, LYDEN D, TATENO M, HICKLIN DJ, ZHU Z, WITTE L, CRYSTAL RG, MOORE MA, RAFII S (2001). Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 193:1005-1014.
64. HATTORI K, HEISSIG B, RAFII S (2003). The regulation of hematopoietic stem cell and progenitor mobilization by chemokine SDF-1. *Leuk Lymphoma* 44:575-582.
65. HEDRICH HJ, BULLOCK G (2004). The laboratory mouse. Oxford, UK: Elsevier.
66. HEINRICH MC, OWZAR K, CORLESS CL, HOLLIS D, BORDEN EC, FLETCHER CD, RYAN CW, VON MEHREN M, BLANKE CD, RANKIN C, BENJAMIN RS, BRAMWELL VH, DEMETRI GD, BERTAGNOLLI MM, FLETCHER JA (2008). Correlation of kinase genotype and clinical outcome in the North American Intergroup Phase III Trial of imatinib mesylate for treatment of advanced gastrointestinal stromal tumor: CALGB 150105 Study by Cancer and Leukemia Group B and Southwest Oncology Group. *J Clin Oncol* 26:5360-5367.
67. HEISSIG B, HATTORI K, DIAS S, FRIEDRICH M, FERRIS B, HACKETT NR, CRYSTAL RG, BESMER P, LYDEN D, MOORE MA (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109:625-637.
68. HEISSIG B, WERB Z, RAFII S, HATTORI K (2003). Role of c-kit/Kit ligand signaling in regulating Vasculogenesis. *Thromb Haemost* 90:570-576.
69. HEROLD G et al (2006). Innere Medizin, Gerd Herold, Köln.

70. HIRSCHOWITZ EA, NAAMA HA, EVOY D, LIEBERMAN MD, DALY J, CRYSTAL RG (1999). Regional treatment of hepatic micrometastasis by adenovirus vector-mediated delivery of interleukin-2 and interleukin-12 cDNAs to the hepatic parenchyma. *Cancer Gene Ther* 6:491-498.
71. HOULSTON RS, PETO J (2004). The search of low-penetrance cancer susceptibility alleles. *Oncogene* 23:6471-6476.
72. HUANG E, NOCKA K, BEIER DR, CHU TY, BUCK J, LAHM HW, WELLNER D, LEDER P, BESMER P (1990). The hematopoietic growth factor KL is encoded by the *Sl* locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the *W* locus. *Cell* 63:225-233.
73. HUANG H, CHEN SH, KOSAI K, FINEGOLD MJ, WOO SL (1996). Gene therapy for hepatocellular carcinoma: long-term remission of primary and metastatic tumors in mice by interleukin-2 gene therapy in vivo. *Gene Ther* 3:980-987.
74. INTAGLIETTA M, MESSMER K (1983). Microangiodynamics, peripheral vascular resistance and the normal microcirculation. *Int J Microcirc Clin Exp* 2:3-10.
75. JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, HAO Y, XU J, THUN M (2009). Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59:225-249.
76. KAMINSKI A, MA N, DONNDORF P, LINDENBLATT N, FELDMEIER G, ONG LL, FURLANI D, SKRABAL CA, LIEBOLD A, VOLLMAR B, STEINHOFF G (2008). Endothelial NOS is required for SDF-1 α /CXCR4-mediated peripheral endothelial adhesion of c-Kit⁺ bone marrow stem cells. *Lab Invest* 88:58-69.
77. KOENIG A, YAKISAN E, REUTER M, HUANG M, SYKORA KW, CORBACIOGLU S, WELTE K (1994). Differential regulation of stem cell factor mRNA expression in human endothelial cells by bacterial pathogens: an in vitro model of inflammation. *Blood* 83:2836-2843.
78. KÖLLER M (2007). Intravitalmikroskopische Analyse der Vascularisierung von Knochnersatzmaterial. www.bergmannsheil.de/470.0.html.
79. KOLLMAR O, JUNKER B, RUPERTUS K, MENDER MD, SCHILLING MK (2007). Studies on MIP-2 and CXCR2 expression in a mouse model of extrahepatic colorectal metastasis. *Eur J Surg Oncol* 33:803-811.
80. KOLLMAR O, JUNKER B, RUPERTUS K, SCHEUER C, MENDER MD, SCHILLING MK (2008). Liver resection-associated macrophage inflammatory protein-2 stimulates engraftment but not growth of colorectal metastasis at extrahepatic sites. *J Surg Res* 145:295-302.
81. KOLLMAR O, MENDER MD, SCHILLING MK (2006). Macrophage inflammatory protein-2 contributes to liver resection-induced acceleration of hepatic metastatic tumor growth. *World J Gastroenterol* 12:858-867.

82. KOLLMAR O, RUPERTUS K, SCHEUER C, JUNKER B, TILTON B, SCHILLING MK, MENDER MD (2007). Stromal cell-derived factor-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis. *Neoplasia* 9:862-870.
83. KOLLMAR O, RUPERTUS K, SCHEUER C, NICKELS RM, HABERL GCY, TILTON B, MENDER MD, SCHILLING MK (2010). CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. *Int J Cancer* 126:1302-1315.
84. KOLLMAR O, SCHILLING MK, MENDER MD (2004). Experimental liver metastasis standards for local cell implantation to study isolated tumor growth in mice. *Clin Exp Metastasis* 21:453-460.
85. KOPS GJ, DE RUITER ND, DE VRIES-SMITS AM, POWELL DR, BOS JL, BURGERING BM (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398:630-634.
86. KRYCZEK I, LANGE A, MOTTRAM P, ALVAREZ X, CHENG P, HOGAN M, MOONS L, WEI S, ZOU L, MACHELON V, EMILIE D, TERRASSA M, LACKNER A, CURIEL TJ, CARMELIET P, ZOU W (2005). CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res* 65:465-472.
87. KUBOTA T, FUJIWARA H, AMAIKE H, TAKASHIMA K, INADA S, ATSUJI K, YOSHIMURA M, MATSUMOTO K, NAKAMURA T, YAMAGISHI H (2004). Reduced HGF expression in subcutaneous CT26 tumor genetically modified to secrete NK4 and its possible relation with antitumor effects. *Cancer Sci* 95:321-327.
88. LASCHKE MW, HÄUFEL JM, ROLLER J, SCHORR H, MENDER MD (2009). Rapamycin, but not cyclosporine A, inhibits vascularization and incorporation of implanted surgical meshes. *Transpl Int* 22:654-662.
89. LASCHKE MW, MENDER MD (2007). In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 13:331-342.
90. LEE BC, LEE TH, AVRAHAM S, AVRAHAM HK (2004). Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1 alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. *Mol Cancer Res* 2:327-338.
91. LEE JH, SEO YW, PARK SR, KIM YJ, KIM KK (2003). Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Canc Res* 63:7247-7255.
92. LEHR HA, LEUNIG M, MENDER MD, NOLTE D, MESSMER K (1993). Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *AM J Pathol* 143:1055-1062.
93. LEUNIG M, YUAN F, MENDER MD, BOUCHER Y, GOETZ AE, MESSMER K, JAIN RK (1992). Angiogenesis microvascular architecture, microhemodynamics and

interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res* 52:6553-6560.

94. LYDEN D, HATTORI K, DIAS S, COSTA C, BLAIKIE P, BUTROS L, CHADBURN A, HEISSIG B, MARKS W, WITTE L (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7:1194-1201.

95. MENDER MD, HAMMERSEN F, WALTER P, MESSMER K (1990). Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg* 38:139-145.

96. MENDER MD, LASCHKE MW, VOLLMAR B (2002). Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34:83-91.

97. MENDER MD, LEHR HA (1993). Scope and perspectives of intravital microscopy-bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14:519-522.

98. MENDER MD, VAJKOCZY P, LEIDERER R, JÄGER S, MESSMER K (1992). Influence of experimental hyperglycemia in microvascular blood perfusion of pancreatic islet isograft. *J Clin Invest* 90:1361-1369.

99. MENDER MD, JÄGER S, WALTER P, HAMMERSEN F, MESSMER K (1990). A novel techniques for studies on the microvasculature of transplanted islets of Langerhans in vivo. *Int J Microcirc Clin Exp* 9:103-117.

100. MESSMER K, FUNK W, ENDRICH B, ZEINTL H (1984). The perspectives of new methods in microcirculation research. *Prog Appl Microcirc* 12:70-90.

101. MIETTINEN M, LASOTA J (2005). KIT (CD117): A review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13:205-220.

102. MILLER-KASPRZAK E, JAGODZINSKI PP (2007). Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Arch Immunol Ther Exp* 55:247-259.

103. MÜLLER A, HOMEY B, SOTO H, GE N, CATRON D, BUCHANAN ME, McCLANAHAN T, MURPHY E, YUAN W, WAGNER SN (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56.

104. NISHIKAWA S, KUSAKABE M, YOSHINAGA K, OGAWA M, HAYASHI SI, KUNISADA T, ERA T, SAKAKURA T, NISHIKAWA SI (1991). In utero manipulation of coat color formation by monoclonal anti-c-Kit antibody: two distinct waves of c-Kit dependency during melanocyte development. *EMBO J* 10:2111-2118.

105. NOLAN DJ, CIARROCCHI A, MELLICK AS, JAGGI JS, BAMBINO K, GUPTA S, HEIKAMP E, McDEVITT MR, SCHEINBERG DA, BENEZRA R, MITTAL V (2007). Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularisation. *Genes Dev* 21:1546-1558.
106. OGAWA M, MATSUZAKI Y, NISHIKAWA S, HAYASHI S, KUNISADA T, SUDO T, KINA T, NAKAUCHI H, NISHIKAWA S (1991). Expression and function of c-Kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 174:63-71.
107. OHIRA S, SASAKI M, HARADA K, SATO Y, ZEN Y, ISSE K, KZAKA K, ISHIKAWA A, ODA K, NIMURA Y, NAKANUMA Y (2006). Possible regulation of migration of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by interaction of CXCR4 expressed in carcinoma cells with tumor necrosis factor-alpha and stromal cell derived factor-1 released in stroma. *Am J Pathol* 168:1155-1168.
108. OKAMOTO R, UENO M, YAMADA Y, TAKAHASHI N, SANO H, SUDA T, TAKAKURA N (2005). Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. *Blood* 105:2757-2763.
109. ONO M, TANAKA N, ORITA K (1986). Complete regression of mouse hepatoma transplanted after partial hepatectomy and the immunological mechanism of such regression. *Cancer Res* 46:5049-5053.
110. ORIMO A, GUPTA PB, SGROI DC, ARENZANA-SEISDEDOS F, DELAUNAY T, NAEEM R, CAREY VC (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL 12 secretion. *Cell* 121:335-348.
111. ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-705.
112. OTTAINO A, DI PALMA A, NAPOLITANO M, PISANO C, PIGNATA S, TATANGELO F, BOTTI G, ACQUAVIVA AM, CASTELLO G, ASCIERTO PA, IAFFAIOLI RV, SCALA S (2005). Inhibitory effects of anti-CXCR4 antibodies on human colon cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 54:781-791.
113. PAN J, MESTAS J, BURDICK MD, PHILLIPS RJ, THOMAS GV, RECKAMP K, BELPERIO JA, STRIETER RM (2006). Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol Cancer* 5:56-57.
114. PAN PY, WANG GX, YIN B, OZAO J, KU T, DIVINO CM, CHEN SH (2008). Revision of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem cell factor function. *Blood* 111:219-228.
115. PAPAYANNOPOULOU T (2004). Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* 103:1580-1585.
116. PAPENFUSS HD, GROSS JF, INTAGLIETTA M, TREESE FA. (1979). A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18:311-318.

117. PEICHEV M, NAIJER AJ, PEREIRA D, ZHU Z, LANE WJ, WILLIAMS M, OZ MC, HICKLIN DJ, WITTE L, MOORE MA, RAFII S (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95:952-958.
118. PHILLIPS RJ, BURDICK MD, LUTZ M, BELPERIO JA, KEANE MP, STRIETER RM (2003). The stromal cell derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1676-1686.
119. PICARO A, KARPOFF HM, NG B, LEE J, BRENNAN MF, FONG Y (1998). Partial hepatectomy accelerates local tumor growth: potential roles of local cytokine activation. *Surgery* 124:57-64.
120. RABAU M, KASHTAN H, BARON S, YOSSIPHOV J, SKORNIK Y, REVEK M, EISENTHAL A (1994). Inhibition of CT26 murine adenocarcinoma growth in the rectum of mice treated with recombinant human interleukin-6. *J Immun Emph Tumor Immunol* 15:257-264.
121. RAFII S, LYDEN D (2003). Therapeutic stem and progenitor cell transplantation of organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 6:702-712.
122. RASHIDI B, AN Z, SUN FX, SASSON A, GAMAGAMMI R, MOOSSA AR, HOFFMAN RM (1999). Minimal liver resection strongly stimulates the growth of human colon cancer in the liver of nude mice. *Clin Exp Metastasis* 17:497-500.
123. RICO-VARGAS SA, WEISKOPF B, NISHIKAWA S, OSMOND DG (1994). C-Kit expression by B cell precursors in mouse bone marrow. Stimulation of B-cell genesis by in vivo treatment with anti-c-Kit antibody. *J Immunol* 152:2845-2852.
124. RISAU W, FLAMME I (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:73-91.
125. RUBIE C, KOLLMAR O, FRICK VO, WAGNER M, BRITTNER B, GRÄBER S, SCHILLING MK (2008). Differential CXC receptor in colorectal carcinomas. *Scand J Immunol* 68:635-644.
126. RUPERTUS K, DAHLEM C, MENDER MD, SCHILLING MK, KOLLMAR O (2009). Rapamycin inhibits hepatectomy-induced stimulation of metastatic tumor growth by reduction of angiogenesis, microvascular blood perfusion, and tumor cell proliferation. *Ann Surg Oncol* 16:2629-2637.
127. RUPERTUS K, KOLLMAR O, SCHEUER C, JUNKER B, MENDER MD, SCHILLING MK (2007). Major but not minor hepatectomy accelerates engraftment of extrahepatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 24:39-48.
128. SAFFRAN DC, HORTON HM, YANKAUCKAS MA, ANDERSON D, BARNHART KM, ABAI AM, HOBART P, MANTHORPE M, NORMAN JA, PARKER SE (1998). Immunotherapy of established tumors in mice by intratumoral injection of interleukin-2 plasmid DNA: Induction of CD8+ T-cell immunity. *Cancer Gene Ther* 5:321-330.

129. SALCEDO R, OPPENHEIM JJ (2003). Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation* 10:359-370.
130. SCHINDEL DT, GROSFELD JL (1997). Hepatic resection enhances growth of residual intrahepatic and subcutaneous hepatoma, which is inhibited by octreotide. *J Pediatr Surg* 32:995-997.
131. SCHMIDT-OTT KM, CHEN X, PARAGAS N, LEVINSON RS, MENDELSON CL, BARASCH J (2006). c-kit delineates a distinct domain of progenitors in the developing kidney. *Dev Biol* 299:238-249.
132. SHINDE PATIL VR, FRIEDRICH EB, WOLLEY AE, GERSZTEN RE, ALLPORT JR, WEISSELEDER R (2005). Bone marrow-derived lin(-)c-kit(+)Sca-1+ stem cells do not contribute to vasculogenesis in Lewis lung carcinoma. *Neoplasia* 7:234-240.
133. STEELE G, RAVIKUMAR TS (1989). Resection of hepatic metastases from colorectal cancer: Biological perspectives. *Ann Surg* 210:127-138.
134. STRIETER RM, POLVERINI PJ, KUNKEL SL, ARENBERG DA, BURDICK MD; KASPER J, DZUIBA J, VAN DAMME J, WALZ A, MARRIOTT D, SHAM-YUEN CHAN, ROCZNIAK S, SHANAFELT AB (1995). The functional role of the ERL motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 270:27348-27357.
135. SUH KW, PIANTADOSI S, YAZDI HA, PARDOLL DM, BREM H, CHOTI MA (1999). Treatment of liver metastasis from colon carcinoma with autologous tumor vaccine expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Surg Oncol* 72:218-24.
136. TACHIBANA K, HIROTA S, IIZASA H, YOSHIDA N, KAWABATA K, KATAOKA Y, KITAMURA Y, MATSUSHIMI K, YOSHIDA N, NISHIKAWA S, KISHIMOTO T, NAGASAWA T (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 6685:591-594.
137. TILTON B, HO L, OBERLIN E, LOETSCHER P, BALEUX F, CLARK-LEWIS I, THELEN M (2000). Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes. *J Exp Med* 192:313-324.
138. TOPF N, WORGALL S, HACKETT NR, CRYSTAL RG (1998). Regional 'prodrug' gene therapy: Intravenous administration of an adenoviral vector expressing the E.coli cytosine deaminase gene and systemic administration of 5-fluorocytosine suppresses growth of hepatic metastasis of colon carcinoma. *Gene Ther* 5:507-13.
139. TSUCHIYA Y, SAWADA S, YOSHIOKA I, OHASHI Y, MATSUO M, HARIMAYA Y, TSUKADA K, SAIKI I (2003). Increased surgical stress promotes tumor metastasis. *Surgery* 133:547-555.

140. TURNER AM, ZSEBO KM, MARTIN F, JACOBSEN FW, BENNETT LG, BROUDY VC (1992). Nonhematopoietic tumor cell lines express stem cell factor and display c-Kit receptors. *Blood* 80:374-381.
141. UBRICH C, DIMMLER S (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ.Res.* 95:343-353.
142. VAIKOCZY P, SCHILLING L, ULLRICH A, SCHMIEDEK P, MENDER MD (1998). Characterization of angiogenesis and microcirculation of high grade glioma: an intravital microfluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:510-520.
143. VOLIN MV, JOSEPH L, SHOCKLEY MS, DAVIES PF (1998). Chemokine receptor CXCR4 expression in endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 242:46-53.
144. VOLLMAR B, LASCHKE MW, ROHAN R, KOENIG J, MENDER MD (2001). In vitro imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *AM J Pathol* 159:1661-1670.
145. WEBER SM, SHI F, HEISE C, WARNER T, MAHVI DM. (1999). Interleukin-12 gene transfer results in CD8-dependent regression of murine CT26 liver tumors. *Ann Surg Oncol* 6:186-194.
146. WITTE ON (1990). Steel locus defines new multipotent growth factor. *Cell* 63:5-6.
147. YANG SX, CHEN JH, JIANG XF, WANG QL, CHEN ZQ, ZHAO W, FENG YH, XIN R, SHI JQ, BIAN XW (2005). Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells promotes the production of vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 335:523-528.
148. YARDEN Y, KUANG WJ, YANG-FENG T, COUSSENS L, MUNEMITSU S, DULL TJ, CHEN E, SCHLESSINGER J, FRANCKE U, ULLRICH A (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 6:3341-3351.
149. ZEELENBERG IS, RUULS-VAN STALLE L, ROOS E (2003). The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Canc Res* 63:3833-3839.
150. ZHANG L, YEGER H, DAS B, IRWIN MS, BARUCHEL S (2007). Tissue microenvironment modulates CXCR4 expression and tumor metastasis in neuroblastoma. *Neoplasia* 9:36-46.
151. ZSEBO KM, WILLIAMS DA, GEISLER EN, BROUDY VC, MARTIN FH, ATKINS HL, HSU RY, BIRKETT NC, OKINO KH, MURDOCK DC, JACOBSEN FW, LANGLEY KE, SMITH KA, TAKEISHI T, CATTANACH BM, GALLI SJ, SUGGS SV (1990). Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63:213-224.

7. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar unter der Leitung von Prof. Dr. med. M. D. Menger durchgeführt. Sie wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Saarland unter der Leitung von Prof. Dr. med. M. K. Schilling erstellt.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. med M. D. Menger für die Bereitstellung der Räumlichkeiten. Darüber hinaus möchte ich mich für seine Anregungen sowie für interessante Diskussionen über das Thema bedanken.

Auch bei Herrn PD. Dr. med. O. Kollmar möchte ich mich herzlich bedanken für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und den unermüdlichen Einsatz im Rahmen dieser Arbeit.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch allen Mitarbeitern des Instituts für die umfassende Unterstützung bei Erstellung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt hier Frau Dr. rer. med. C. Scheuer für die Vorbereitung der Tumorzellen, die Erstellung der Western Blots und die zahlreichen fachlichen Diskussionen sowie Frau J. Becker für die Erstellung der histologischen und immunhistochemischen Präparate.

Außerdem danke ich Frau K. Rupertus für die gute Einarbeitung in das Thema und die zuverlässige Unterstützung der Arbeit.

Mein ganz persönlicher und besonderer Dank geht an meine Familie, meinen Verlobten und an meine Freunde ohne deren langjährige Unterstützung und Motivation meine Ausbildung und diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre.

8. Publikationen

1. Rupertus K, **Haberl GCY**, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O (2010) Bone marrow suppression by c-Kit blockade enhances tumor growth of colorectal metastases mediated by Stromal Cell-derived Factor (SDF)-1. [in preparation].
2. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Nickels RM, **Haberl GCY**, Tilton B, Menger MD, Schilling MK (2010) CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. Int J Cancer 126:1302-1315.

Publizierte Abstracts

1. **Haberl GCY**, Rupertus K, Scheuer C, Tilton B, Schilling MK, Menger MD. Das durch Knochenmarksuppression verstärkte Wachstum kolorektaler Metastasen wird über Stromal cell-derived Factor (SDF)-1 durch Beeinflussung der Angiogenese und Induktion der Tumorzellproliferation vermittelt. Chir Forum 2008; Band 37:55-56.
2. Rupertus K, **Haberl GCY**, Scheuer C, Tilton B, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O. Bone marrow suppression enhances tumor growth of colorectal metastasis due to stromal cell-derived factor(SDF)-1 related stimulation of angiogenesis and tumor cell proliferation. Onkologie 2008; 31 Suppl. 1:61.
3. Rupertus K, **Haberl GCY**, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O. Blockade of endothelial precursor cells enhances tumor growth of colorectal metastases due to stromal cell-derived factor (SDF)-1 related stimulation of angiogenesis and tumor cell proliferation. Langenbecks Arch Surg. 2008; 393:775.
4. Rupertus K, Scheuer C, **Haberl GCY**, Junker B, Tilton B, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O. Blockade of SDF-1 does not affect metastatic tumor growth due to activation of an alternative, CXCR4-VEGF-dependent pathway after liver resection. Langenbecks. Arch Surg. 2007;392.

Poster

1. Rupertus K, **Haberl GCY**, Scheuer C, Tilton B, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O. Das durch Knochenmarkdepression verstärkte Wachstum von kolorektalen Metastasen wird über Stromal Cell-derived Factor (SDF)-1 durch Beeinflussung der

Angiogenese und Induktion der Tumorzellproliferation vermittelt. Viszeralmedizin 2008, Berlin.

2. Rupertus K, **Haberl GCY**, Scheuer C, Tilton B, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O. Bone marrow suppression enhances tumor growth of colorectal metastases due to Stromal cell-derived factor (SDF)-1 related stimulation of angiogenesis and tumor cell proliferation. 28. Deutscher Krebskongress, Berlin 2008.
3. Rupertus K, **Haberl GCY**, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O. Blockade of endothelial precursor cells enhances tumor growth of colorectal metastasis due to stromal cell-derived factor (SDF)-1 related stimulation of angiogenesis and tumor cell proliferation. 23. Jahrestagung der Gastroenterologischen Arbeitsgemeinschaft Rheinland-Pfalz/Saarland (GARPS), Bad Kreuznach 2008.

Freie Vorträge

1. **Haberl GCY**, Rupertus K, Scheuer C, Tilton B, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O. Das durch Knochenmarksuppression verstärkte Wachstum kolorektaler Metastasen wird über Stromal cell-derived factor (SDF)-1 durch Beeinflussung der Angiogenese und Induktion der Tumorzellproliferation vermittelt. 125. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin 2008.
2. Rupertus K, **Haberl GCY**, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O. Blockade of endothelial precursor cells enhances tumor growth of colorectal metastases due to stromal cell-derived factor (SDF)-1-related stimulation of angiogenesis and tumor cell proliferation. 12. Chirurgische Forschungstage, Freiburg 2008.
3. Rupertus K, Scheuer C, **Haberl GCY**, Junker B, Tilton B, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O. Die Blockade von SDF-1 nach Leberresektion hat aufgrund eines zusätzlichen aktivierten CXCR4/VEGF-abhängigen Signalwegs keinen Einfluss auf das metastatische Tumorwachstum. 125. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Chirurgisches Forum, München 2008.
4. Rupertus K, Scheuer C, **Haberl GCY**, Junker B, Tilton B, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O. Die Neutralisierung von SDF-1 kann das verstärkte Wachstum extrahepatischer Tumoren nach Leberresektion nicht hemmen, bedingt durch die Aktivierung eines CXCR-4-VEGF-abhängigen Signalweges. 11. Chirurgische Forschungstage, Saarbrücken 2007

9. Lebenslauf

Geburtsdatum: 08. 01. 1984 in München

Schul Ausbildung und Studium

09/1990-07/1994	Grundschule Wildsteig (Obb.)
09/1994-06/2002	Gymnasium Weilheim (Obb.)/ Werdenfels-Gymnasium Garmisch-Partenkirchen
10/2002-06/2009	Medizinstudium an der Universität des Saarland-Homburg (Saar)
03/2005	Ärztliche Vorprüfung
06/2009	2. Staatsexamen und Approbation

Praktisches Jahr

02/2008-06/2008	Praktisches Jahr, 1. Tertial: Innere Medizin, Universitätsklinikum Homburg (Saar)
06/ 2008-10/2008	Praktisches Jahr, 2.Tertial: Augenheilkunde, Kantonsspital Aarau
10/2008-01/2009	Praktisches Jahr, 3.Tertial: Chirurgie, Kantonsspital Winterthur

Berufserfahrung

08/07-01/08	Anstellung am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Homburg zur Fortführung tierexperimenteller Arbeiten
seit 07/2009	Anstellung als Assistenzärztin an der Augenklinik des Knappschaftskrankenhauses Sulzbach (Saar)